

Die Bedeutung des Arylhydrocarbon Rezeptors für die antileukämische Wirkung von Flavonoiden und Indolen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Angefertigt am Institut für Umweltmedizinische Forschung gGmbH (IUF)

vorgelegt von

Andreas Goergens

aus Düsseldorf

Düsseldorf

2009

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Prof. Dr. Charlotte Esser

Korreferent: Prof. Dr. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juni 2009

Gewidmet meinem Vater und meiner Tante Waldi

Danke für Alles

Inhalt

I. Einleitung.....	8
1. Leukämie	9
1.1 Die Leukämiezelllinie HL-60	10
2. Apoptose und Zellzyklus	10
2.1 Der Zellzyklus.....	11
2.2 Die Apoptose	13
2.3 Die Rolle von ROS	15
3. Sekundäre Pflanzenmetabolite	16
3.1 Allgemeines	16
3.2 Flavonoide.....	16
3.2.1 Curcumin	17
3.2.2 Quercetin	18
3.3 Das Indol Indirubin	19
3.4 Pflanzeninhaltsstoffe und „functional food“	20
4. Der Arylhydrocarbon Rezeptor	21
4.1 Allgemeines	21
4.2 Die Aktivierung des AhR Signalwegs	22
4.3 Liganden des AhR.....	23
4.4 Beteiligung des AhR an anderen Signalwegen	25
4.5 Der AhR und ausgewählte Pflanzeninhaltsstoffe	25
5. Fragestellung	27
II. Material und Methoden	29
1. Material.....	29
1.1 AhR Agonisten / Antagonisten	29
1.2 Feinchemikalien und Verbrauchsmaterial	29
1.3 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme für molekularbiologische Methoden.....	30
1.4 Puffer und Medien	30
1.5 Oligonukleotide (Primer)	34
1.6 Plasmide, si- und shRNA.....	35
1.6.1 Plasmid zur Expression des AhR-GFP Fusionsproteins	35
1.6.2 Plasmide zur Expression von shRNA	35
1.6.3 siRNA.....	35
1.7 Antikörper	36

1.7.1 Antikörper zur Immunhistochemische Färbung.....	36
1.7.2 Antikörper für Western Blot	36
1.8 Software	36
2. Methoden	37
2.1 Zellbiologische Methoden	37
2.1.1 Zellkultur	37
2.1.2 ROS- Messung	37
2.1.3 Messung des Mitochondrien Membranpotentials	37
2.1.4 Zellzyklusmessung	38
2.1.5 Caspase Assay	39
2.1.6 MTT-Viabilitäts Assay	39
2.1.7 Immunhistochemische Färbung	40
2.1.8 Transfektion mit Amaxa.....	40
2.1.8.1 Transfektion von siRNA.....	40
2.1.8.2 Transfektion von DNA	41
2.1.9 Retrovirale Transduktion zur Expression von shRNA.....	41
2.2 Molekularbiologische Methoden	44
2.2.1 RNA Isolierung	44
2.2.2 Bestimmung der RNA Konzentration	44
2.2.3 Reverse Transkription	44
2.2.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	45
2.2.5 Echt-Zeit-PCR (engl. Real-time-PCR).....	46
2.2.6 Semiquantitative PCR	47
2.2.7 Biotinylierung der RNA	47
2.2.8 Microarrayanalyse	48
2.2.9 Protein-Isolierung.....	48
2.2.10 SDS-PAGE	48
2.2.11 Western Blot.....	49
2.2.12 Immunochemische Detektion von Proteinen	49
III. Ergebnisse	51
1. Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin haben eine wachstumshemmende Wirkung auf HL-60 Zellen	51
1.1 Die Mechanismen der Wachstumshemmung in HL-60 Zellen.....	52

1.1.1. Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin induzieren die Caspase Aktivität in HL-60 Zellen.....	52
1.1.2 Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin regulieren Gene der bcl-2 Familie 53	
1.1.3 Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin bewirken einen Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$).....	54
1.1.4 Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin reduzieren den ROS-Gehalt in HL-60 Zellen.....	56
1.1.5 Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin blockieren den Zellzyklus in HL-60 Zellen.....	57
1.1.6 Tabellarische Zusammenschau der Ergebnisse.....	60
2. Der AhR in HL-60 Zellen.....	60
2.1 HL-60 Zellen exprimieren den AhR.....	60
2.2 Der AhR ist aktivierbar in HL-60 Zellen.....	61
2.3 Das AhR Zielgen CYP1a1 ist induzierbar in HL-60 Zellen.....	62
2.4 Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin aktivieren den AhR in HL-60 Zellen ..	63
2.5 Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin induzieren das Zielgen Cyp1a1 des AhR in HL-60 Zellen.....	64
3. Blockieren des AhR in HL-60 Zellen.....	65
3.1 Blockierung der Translation des AhR durch stabil exprimierte shRNA	65
3.2 Blockierung der AhR Translation durch siRNA.....	66
3.3 Blockierung des AhR durch spezifische Antagonisten.....	68
4. Beteiligung des AhR an den Effekten von Curcumin und Indirubin-3'-oxim in HL-60 Zellen.....	71
4.1 Der AhR ist nicht an der wachstumshemmenden Wirkung von Curcumin und Indirubin-3'-oxim auf HL-60 Zellen beteiligt	71
4.2 Der AhR ist an der Induktion der Effektorcaspasen 3/7 durch Curcumin beteiligt....	72
4.3 Die Regulation der Gene der bcl-2 Familie geschieht in HL-60 Zellen unabhängig vom AhR.....	74
4.4 Die Blockierung des AhR mit Antagonisten hat keinen Einfluss auf den Zellzyklus in HL-60 Zellen.....	75
4.5 Die Reduzierung des ROS-Gehalts in HL-60 Zellen durch Curcumin und Indirubin-3'-oxim ist unabhängig vom AhR.....	77
5. Andere Signalwege die durch Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin beeinflusst werden	78
6. Microarrayanalyse von HL60 Zellen nach Curcumin Behandlung.....	80
6.1 Gene Ontology Analyse nach Curcumin Behandlung	80

6.2 Validierung der Microarraydaten.....	82
6.3 Vergleich der eigenen Microarraydaten mit anderen Expressionsprofilen von HL-60 Zellen	83
IV. Diskussion:.....	87
1. Durch welche Mechanismen wirken Curcumin, Quercetin und Indirubin-3'-oxim antileukämisch in HL-60 Zellen?	88
2. Welche Rolle spielt der AhR bei der antileukämischen Wirkung von Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin?.....	91
3. Welche anderen Signalwege sind an der antileukämischen Wirkung von Curcumin beteiligt?	96
V. Zusammenfassung:.....	98
VII. Anhang.....	113

I. Einleitung

Jährlich sterben in Deutschland 220 000 Menschen an Krebs und eine halbe Millionen Krebserkrankungen werden jedes Jahr neu registriert.¹ Somit ist Krebs die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Gupte, 2008). Die Suche nach Risikofaktoren und Behandlungsansätzen setzt umfangreiche Laborstudien und die aufwändige Beobachtung großer Bevölkerungsgruppen voraus. Die Entwicklung und Prüfung neuer Medikamente oder Therapieverfahren muss strengen Qualitätsanforderungen genügen und wird daher über einen Zeitraum von mindestens 10 Jahren durchgeführt und in vier Phasen unterteilt (Finn, 2000). Diese vier Phasen dienen der Aufklärung der Verträglichkeit und Sicherheit des Medikaments (Phase I), der Findung der geeigneten Therapiedosis (Phase II) und nach Erbringung eines signifikanten Wirkungsnachweises (Phase III) die Kontrolle der Therapie nach der Markteinführung (Phase IV) zur Feststellung sehr seltener Nebenwirkungen, die erst in großen Patientenkollektiven erkennbar sind. Bevor solche Studien jedoch durchgeführt werden können, müssen die potentiellen Wirkstoffe ermittelt werden. Hierbei orientiert man sich häufig an bereits bekannten Substanzen. Meist wird auch in Hochdurchsatzverfahren nach neuen Stoffen gesucht, die generell eine Wirkung im Stoffwechsel von Zellen haben (Nandakumar, 2008). Um die Wirkung einer so gefundenen oder bereits bekannten Substanz besser beurteilen und Risiken abschätzen zu können, muss der Mechanismus der ihrer Wirkung zu Grunde liegt vollständig aufgeklärt werden. Z.B. finden zurzeit groß angelegte Studien zur Aufklärung der Wirkmechanismen traditioneller Medizin aus Asien oder Südamerika statt, um diese in Zukunft gezielter einsetzen zu können. Substanzen, die wir mit der Nahrung aufnehmen, und von denen bekannt ist, dass ihre Einnahme das Risiko an Krebs zu erkranken oder die Chance davon geheilt zu werden erhöhen oder verringern kann, sind hierbei von großem Interesse (Anand, 2008a). Der spezielle Fall Leukämie macht die Suche nach den Wirkmechanismen neuer Therapeutika sehr schwierig, da die auslösenden Faktoren äußerst heterogen sind und meist sehr individuell therapiert werden muss. Die Therapie und auch die Prävention von Leukämie brauchen somit für die optimale Wirksamkeit und zum gezielten Einsatz ein so detailliertes Bild wie möglich von den antileukämischen Mechanismen der eingesetzten Substanzen.

¹ Studie der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut (RKI), Februar 2008

1. Leukämie

Bösartige (maligne) Neubildungen bestehen aus entarteten Zellen, die eine andere Morphologie als gesunde Zellen aufweisen, sich anders und schneller teilen und dabei das gesunde Gewebe zerstören. Sie wandern von ihrem Ursprungsort aus über das Blut oder das Lymphsystem in die Peripherie und vermehren sich dort als Tochtergeschwülste (Metastasen) weiter. Es gibt zwei Gruppen bösartiger Neubildungen. Zum einen gibt es solide, also feste bzw. harte Tumore wie Karzinome die aus entarteten Epithelzellen, den "Deckzellen" der Haut, der Schleimhaut sowie aus Drüsenzellen entstehen. Die andere Gruppe bilden die Sarkome, die aus entarteten Bindegewebszellen als Fibrosarkome, Muskelzellen als Myosarkome, Fettzellen als Liposarkome und Knochenzellen als Osteosarkome entstehen können und bösartige Hämoblastosen, wie z.B. Leukämien, die aus Zellbestandteilen des Bluts und der blutbildenden Organe entstehen (Parkin, 2005). Leukämie auch Blutkrebs genannt ist eine Krebserkrankung der weißen Blutzellen (Leukozyten). Symptome einer Leukämie sind Müdigkeit, Blässe, erhöhte Infektanfälligkeit und Blutungsneigung. Eine Leukämie zeichnet sich durch eine überschießende Vermehrung einer Leukozytenart im Knochenmark, die jedoch unreif und nicht funktionstüchtig ist, aus. Dadurch wird die normale Blutbildung gestört, und es kommt zu einem Mangel aller Formen von Blutzellen (Montserrat, 2008). Man unterscheidet zwei Arten der Leukämie, die myeloische und lymphatische Leukämie, die des Weiteren jeweils in eine akute und eine chronische Form unterteilt werden. Die häufigste Form der Leukämie ist die chronische lymphatische Leukämie (CLL) bei der das Risiko für eine Erkrankung mit zunehmendem Lebensalter steigt. Die CLL ist die gutartigste Form der Leukämie, bei der einige Patienten eine normale Lebenserwartung haben. Die chronische myeloische Leukämie (CML) wird am Häufigsten bei Erwachsenen zwischen dem fünfzigsten und sechzigsten Lebensjahr diagnostiziert und macht im Kindes- und Jugendalter nur etwa 3% aller Leukämie-Fälle aus. Die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter ist die akute lymphatische Leukämie (ALL). Von den akuten Leukämien im Erwachsenenalter sind 80% akute myeloische Leukämien (AML). Der therapeutische Ansatz zur Behandlung von Leukämien sind meist Chemotherapie, Strahlentherapie oder Knochenmarktransplantationen (Burmeister, 2001). Für diese Arbeit ist speziell die AML von Bedeutung. Die AML entsteht in einem Mehrstufenprozess durch die maligne Transformation pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen (Appelbaum, 2001), die ihre Fähigkeit zur Differenzierung in funktionstüchtige Granulozyten und Monozyten verloren haben und deren Vermehrung unkontrolliert erfolgt. Klinisch führt dies zur Expansion und Akkumulation unreifer Blasten im Knochenmark und Verdrängung der normalen Blutbildung. Die

betroffenen Patienten leiden durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese an Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie. Zur Einschätzung der Ausdehnung einer Krebs-Erkrankung werden diese in Klassifikationen eingeteilt. Die bei soliden Tumoren benutzten Einteilungen (z.B. TNM) sind auf Leukämien jedoch nicht übertragbar. Seit einigen Jahren werden die akuten Leukämien aufgrund von Gestalt, Größe und Art der betroffenen weißen Blutzellen nach der von der French-American-British-Cooperative-Group entwickelten FAB-Klassifikation eingeteilt. Die myeloischen Leukämien werden nach dem Ausreifungsgrad und der betroffenen Blutzellreihe in M1 bis M7 unterteilt. Bei den lymphatischen Leukämien werden in Abhängigkeit von der Zellgröße L1- bis L3-Morphologien unterschieden. Zytogenetische Veränderungen spielen inzwischen zur Prognoseabschätzung eine wichtigere Rolle als die Morphologie.

1.1 Die Leukämiezelllinie HL-60

Als Modell für die AML wurden in dieser Arbeit HL-60 Zellen eingesetzt. Zum ersten Mal beschrieben wurde die HL-60 Zelllinie von Collins *et al.* (Collins, 1978; Collins, 1987). HL-60 Zellen sind Promyelozyten, die von einer Patientin mit akuter myelotischer Leukämie abstammen und gemäß der FAB-Klassifikation der akuten promyelozytären Leukämie zugeordnet und als FAB-M3 bezeichnet (Gallagher, 1979) wurden. Spätere Untersuchungen, welche die Merkmale der HL-60 Zelllinie mit den Eigenschaften der akuten promyelozytären Leukämie verglichen (Ia-Favera, 1983; Le Beau, 1985), kamen zu dem Ergebnis, dass unter Einbeziehung des klinischen Verlaufs der Erkrankung, die HL-60 Zellen neu zu klassifizieren seien. Zurzeit wird davon ausgegangen, dass die HL-60 Zellen nach FAB als M2-Typ zu bezeichnen sind, welches einer akuten myelotischen Leukämie entspricht. Den HL-60 Zellen fehlen bestimmte Marker, sie weisen jedoch phagozytische Aktivität und Chemotaxis auf (Dalton, Jr., 1988).

2. Apoptose und Zellzyklus

Die am häufigsten eingesetzten Ansätze zur Bekämpfung von Krebs sind die Regulierung des Zellzyklus und die Induktion des kontrollierten Zelltods (Apoptose) in den entarteten Zellen (Shah, 2005). Die in Krebszellen entarteten Gene sind in den meisten Fällen in die Regulierung des Zellzyklus und die Induktion der Apoptose involviert wie z.B. das

Tumorsuppressoren p53 oder c-myc, welche die Proliferation der Zellen reguliert (Drexler, 1998). Mutationen dieser Gene führen meist zu einer unkontrollierten Vermehrung und fehlender Differenzierung der betroffenen Zellen und einer Verdrängung intakter Gewebe durch diese nicht oder unzureichend funktionellen Zellen. Ziel der Krebsforschung ist die Fehler im Verlauf des Zellzyklus oder Regulierung der Apoptose aufzuklären und zu eliminieren, oder sich diese Fehler zu nutzen zu machen um die entarteten Zellen selektiv abzutöten. Hierzu werden z.B. Stoffe entwickelt oder gesucht, die an den entarteten Signalwegen in Krebszellen angreifen um den normalen Ablauf des Zelltodes einzuleiten (Belka, 2004). Der Zellzyklus und die Apoptose sind somit die Hauptangriffspunkte der modernen aber auch der traditionellen Medizin, obwohl mittlerweile die Einleitung der Differenzierung in Krebszellen als neuer Ansatz immer intensiver untersucht wird (Sell, 2006).

2.1 Der Zellzyklus

Unter Zellzyklus versteht man den Zeitraum zwischen der Entstehung einer Zelle aus einer Mutterzelle, und ihrer erneuten Teilung in zwei weitere Tochterzellen. Dieser Zeitraum unterteilt sich in die Mitose (M)- Phase und die Interphase, die ihrerseits wiederum in G₁-, S- und G₂- Phase unterteilt ist (Nigg, 1995). Die G₁-Phase ist die erste Wachstumsphase der Zelle in der aber keine Synthese von DNA statt findet (G kommt von gab: Pause (bezüglich der Verdoppelung von Erbmaterial)). In der S-Phase findet die Verdoppelung der DNA (Replikation) statt und es werden zwei einander gleiche Chromatiden aufgebaut. In der zweiten Wachstumsphase, der G₂-Phase oder auch Postsynthesephase wächst die Zelle weiter und schließt die Vorbereitung für die Mitose ab, wobei sie ungefähr auf das Doppelte anwächst. Bei Säugetierzellen dauert ein Zellzyklus ca. 22 Stunden, wobei 90% der Zeit auf die Interphase und 10% auf die Mitose entfallen. Differenziert eine Zelle zu einer Dauerzelle, so verlässt sie den Zellzyklus und teilt sich dann nicht mehr. Dieser Zustand wird als G₀-Phase bezeichnet. Im Zellzyklus gibt es spezifische Punkte, an denen kontrolliert wird, ob alle Kriterien für den Eintritt in die nächste Phase erfüllt sind. Zum Beispiel muss vor der G₂-Phase die DNA vollständig repliziert sein. An solchen Kontrollpunkten besteht dann die Möglichkeit einer Unterbrechung (Arretierung) des Zellzyklus oder auch der Apoptose, des eingeleiteten programmierten Zelltodes (Burhans, 2003). Es existieren spezielle Zellzyklusproteine wie die CDKs (Cyclin dependent Kinases) und die sog. Zykline. Zu bestimmten Zeitpunkten im Zyklus werden diese Proteine verstärkt exprimiert, bis die

Konzentration ein Maximum erreicht. Von diesem Maximum nimmt man an, dass es den Kontrollpunkt darstellt. Danach werden die Zykline schnell abgebaut. CDKs bilden mit ihrem zugehörigen Zyklin Komplexe, deren (De-) Aktivierung unter anderem durch Wachstumsfaktoren und Protoonkogene gesteuert wird. Protoonkogene sind noch nicht aktivierte, also nicht mutierte Onkogene (wörtlich Krebs-Gene), d.h. Gene deren potentielle Mutation den Übergang vom normalen Wachstumsverhalten der Zelle zu ungebremstem Tumorwachstum fördert. Eine weitere Kontrollfunktion für die Aktivität von vielen CDK/Zyklin-Komplexen ist den CDK-Inhibitoren zuzuschreiben. Diese inhibitorischen Proteine werden in zwei Familien aufgeteilt: der CIP/KIP-Familie (p21, p27 und p57) und der INK-Familie (p15, p16, p18 und p19) (Harper and Elledge, 1996). Über ihren N-Terminus können diese Proteine an bestimmte CDKs koppeln und so die Bildung des CDK/Zyklin Komplexes verhindern. Die CDKI der INK Familie inhibieren spezifisch den Eintritt der Zelle in die G₁-Phase, während die Inhibitoren der CIP/KIP unspezifisch an jedem Punkt des Zellzyklus angreifen können (Abb. 1). Werden die CDK/Zyklin Komplexe gebildet phosphorylieren sie gezielt eine Reihe weiterer Proteine wie das Retinoblastomprotein (Rb) und steuern so den Zellzyklus. Das Rb bindet abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus Transkriptionsfaktoren wie E2F der für die Aktivierung einer Vielzahl für die Zellproliferation wichtiger Gene verantwortlich ist (Johnson, 1993; Weintraub, 1992). Wird das Rb phosphoryliert, gibt es die Transkriptionsfaktoren frei und der Zellzyklus wird in Gang gesetzt. Beeinträchtigungen in der Regulation des Zellzyklus können bei der Entstehung von Tumoren eine wichtige Rolle spielen. Übermäßige Expression von Zyklinen bei Lymphomen oder Lungenkarzinomen ist ein Beispiel für die Störung eines Zellzyklus-Aktivators (Drexler, 1998). Die Inaktivierung von Zellzyklus-Inhibitoren durch Genmutationen ist ebenfalls ein wichtiger Beitrag zur Entstehung von Krebszellen. Krebszellen vermehren sich nach Desregulierung des Zellzyklus unkontrolliert und erreichen durch mangelnde Differenzierung selten ihre normale Funktionalität, wodurch sie dem Organismus schaden (Johansson, 2008).

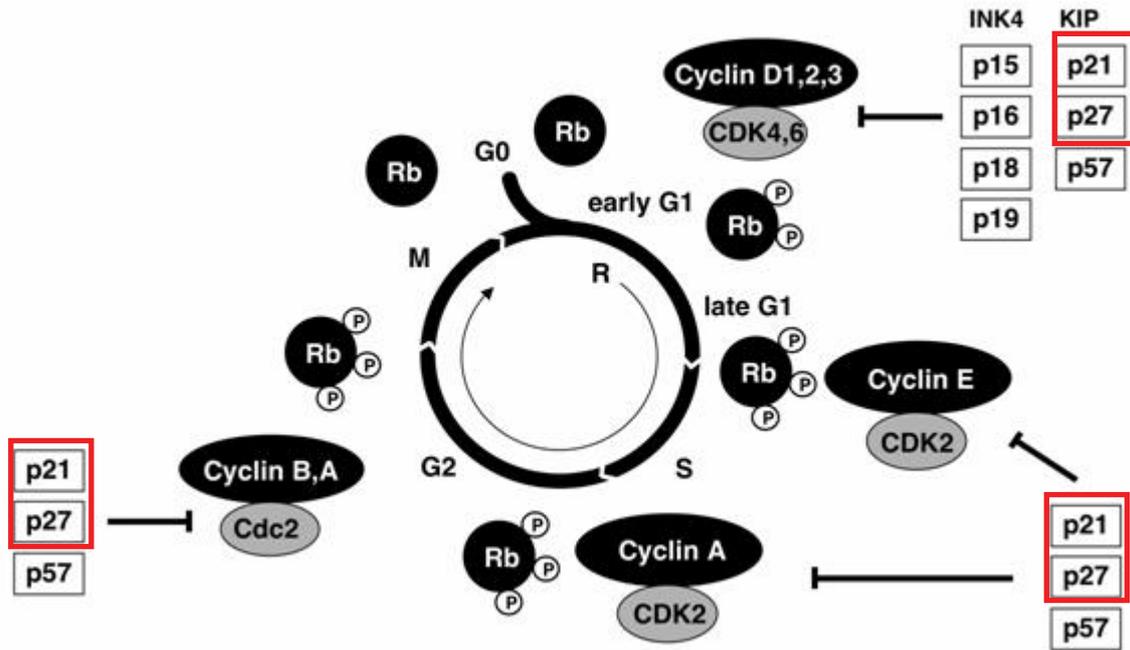


Abb. 1: In jeder der Zellzyklusphasen sind spezifische Zykline exprimiert, die mit spezifischen zyklinabhängigen Kinasen (CDK) interagieren und sie hierdurch aktivieren. CDK-Inhibitoren (CDKI) wie p21 und p27 (rote Kästen) können diese Zyklin/CDK Komplexe in jeder Zellzyklusphase hemmen und Zellzyklusarrest auslösen. Die CDKIs der INK4a-Familie hemmen G1-Phase Zykline während die CDKIs der KIP-Familie auch S- und G2-Phase Zyklin/CDK-Komplexe hemmen (Mu, 2007).

2.2 Die Apoptose

Ein Ausweg aus einem gestörten Zellzyklus an einem bestimmten Kontrollpunkt kann die Apoptose (griechisch: Laub, das vom Baum fällt) sein. Die Apoptose bezeichnet das forcierte Absterben einer Zelle nach einem genetischen Programm. Im erwachsenen Organismus werden kranke, alte oder nutzlose Zellen durch ein komplexes System aus Signalen und Botenstoffen in den Selbstmord getrieben. In der Apoptose also dem aktiven Zelltod rundet sich die Zelle ab und schrumpft; die DNA wird systematisch abgebaut. Im Gegensatz zur Nekrose, dem passiven Zelltod, wird der Inhalt der apoptotischen Zelle in Membranvesikeln (apoptotische Körperchen) verpackt und ohne Enzymfreisetzung von Nachbarzellen phagozytiert (Bursch, 2000). In der Nekrose bricht der Zellstoffwechsel zusammen, die Zelle schwillt und die zellulären Membranen lösen sich auf. Im Gegensatz zur Nekrose einer Zelle führt die Apoptose nicht zu Entzündungen oder anderen Komplikationen im Organismus (Schlag, 1991). Es werden zwei Wege der zur Einleitung der Apoptose unterschieden: Einerseits die über Schädigung der DNA initiierte Mitochondrien vermittelte, andererseits die

Rezeptor-Ligand vermittelte Apoptose (Cohen, 1996; Fadeel, 2005; Hofmann, 1999). Der Mitochondrien vermittelte Apoptoseweg wird auch als intrinsischer Weg bezeichnet und der Rezeptor vermittelte als extrinsischer Weg (Abb. 2).

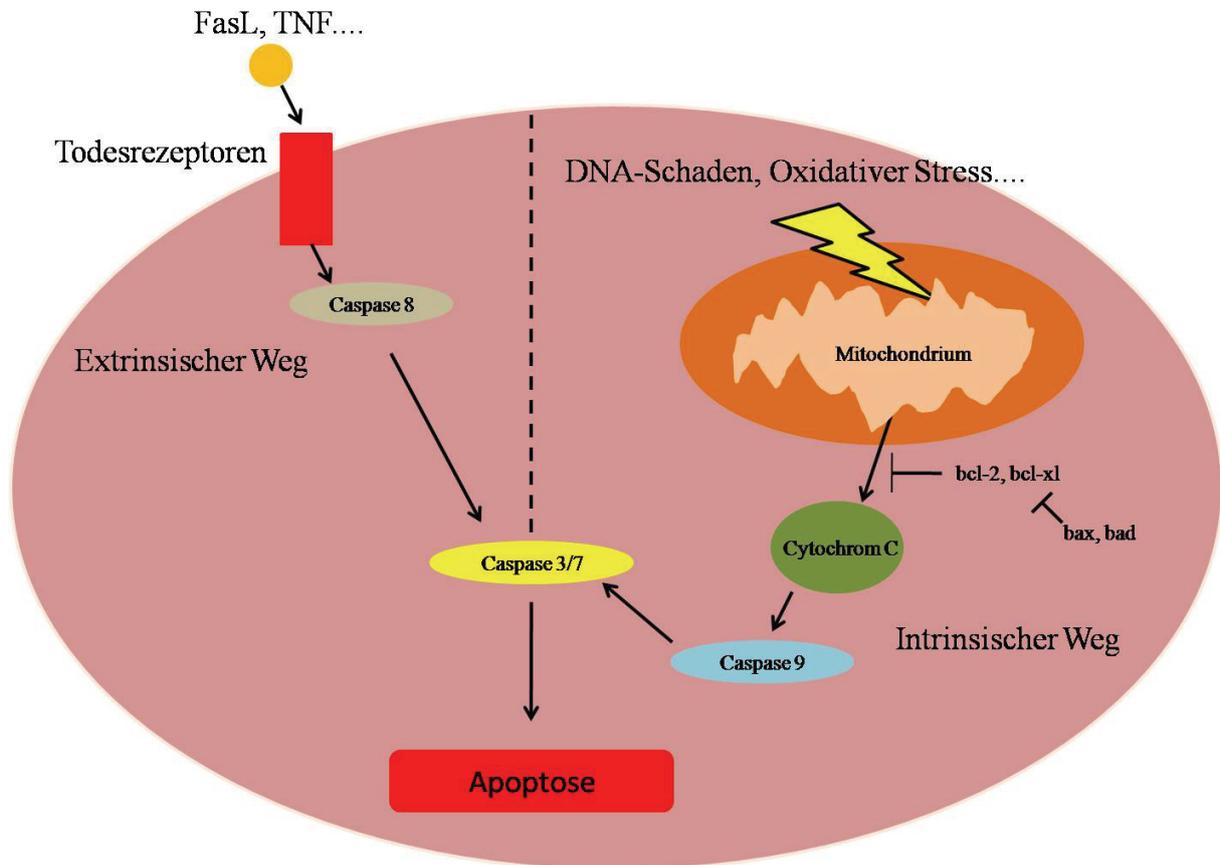


Abb. 2: Ligandenvermittelter (extrinsischer) und Mitochondrienvermittelter (intrinsischer) Apoptoseweg.

Die Gene der bcl-2 Familie wie bcl-2, bcl-xl, bax und bad sind maßgeblich an der Regulierung der Apoptose über den Mitochondrien abhängigen Weg beteiligt (Abb. 2). Hierbei ist besonders das Verhältnis zwischen den proapoptotischen Proteinen wie bax oder bad und den antiapoptotischen Proteinen wie bcl-2 oder bcl-xl von Bedeutung. Durch Heterodimerenbildung von anti- mit proapoptotischen Proteinen können sich die Mitglieder der bcl-2-Familie in ihrer Funktion auch gegenseitig beeinflussen. Bcl-2 und bcl-xl verhindern hierbei den Ausstrom von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien, wogegen dieser von bax und bad gefördert wird. Das Verhältnis dieser Proteine spiegelt sich auch auf Expressionsebene wieder und kann so mit Hilfe einer PCR bestimmt werden. Da bax selektiv mit bcl-2 und bad selektiv mit bcl-xl heterodimerisiert (Danial, 2007) und sich diese Paare somit in ihrer Funktion beeinflussen wird meistens das Verhältnis von bax zu bcl-2 und bad zu bcl-xl bestimmt um ein Maß für die mitochondriale Apoptoseinduktion zu bekommen. Der durch die Gene der bcl-2 Familie regulierte Ausstrom

an proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien ist an der Aktivierung des Apoptosoms beteiligt, das eine Enzymkaskade in Gang setzt. Dieser vermehrte Ausstrom führt in den meisten Fällen zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$).

Die Rezeptor-Liganden vermittelte Apoptose wird durch sogenannte Todesliganden wie FasL (Fas-Ligand) oder TNF (Tumornekrosefaktor) initiiert, die an für sie spezifische Todesrezeptoren binden. Diese Todesrezeptoren sind Transmembranproteine, die das Signal in das Zelllumen weiterleiten und so wie bei der Mitochondrien vermittelten Apoptoseinduktion eine Enzymkaskade in Gang bringt. Die wichtigsten Enzyme dieser Kaskaden sind die Caspasen (Cystein Aspartat Proteasen). Caspasen sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat schneiden (Cysteiny-Aspartasen). Sogenannte Effektor-Caspasen, vornehmlich Caspasen 3, 6 und 7 führen zum apoptotischen Tod der Zelle. Sie aktivieren einerseits sekundäre Zielproteine (z. B. Caspase aktivierte DNase, CAD, oder andere Caspasen) durch Proteolyse. Andererseits sind sie selbst aktiv am Abbau der Zellkernmembran und des Zytoskeletts beteiligt oder können die DNA-Reparatur unterdrücken (Hale, 1996).

Die Effektor-Caspasen selbst, werden durch die Initiator-Caspasen aktiviert. Die Initiator-Caspasen sind spezifisch für die zwei Wege der Apoptoseinduktion. Die Signalweiterleitung des intrinsischen Wegs geschieht vornehmlich über Caspase 9, die des extrinsischen Wegs über Caspase 8 (Abb. 2).

2.3 Die Rolle von ROS

ROS (reaktive Sauerstoffspezies) bezeichnet Moleküle wie das Superoxid anion (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxid ($\cdot OH$)-Radikale, die aus H_2O_2 gebildet werden. Der ROS-Gehalt von Zellen ist unmittelbar abhängig von der Menge freien Glutathions und der Neuproduktion an ROS (Clerkin, 2008). Die Bildung von ROS spielt eine entscheidende Rolle bei der Apoptose, denn sie können als reaktionsfähige Teilchen nahezu alle Biomoleküle „angreifen“ und funktionell verändern. Die bedeutendsten Schadmechanismen stellen Membranschädigungen aufgrund von Lipidperoxidation und DNA-Schäden dar, die in der Folge zu mutagenen und kanzerogenen Ereignissen führen können (Marnett, 2000). Zusätzlich wird (zur Unterdrückung dieser Folgeschäden) in den Zellen Apoptose induziert

(Davies, 1999). Paradoxerweise kann ROS jedoch in niedrigeren Konzentrationen einigen Systemen durch Aktivierung von NF- κ B anti-apoptotisch wirken (Kim, 2008).

3. Sekundäre Pflanzenmetabolite

3.1 Allgemeines

Sekundäre Pflanzenstoffe (Sekundärmetabolite, im naturheilkundlichen Bereich auch Phytamine genannt) leiten sich von Produkten des anabolen und katabolen Stoffwechsels ab, hauptsächlich von Carbonsäuren, Kohlenhydraten und Aminosäuren (Smetanska, 2008). Sekundärmetaboliten sind bestimmte chemische Verbindungen, die von Pflanzen weder im Energiestoffwechsel, noch im aufbauenden (anabolen) oder im abbauenden (katabolen) Pflanzenstoffwechsel produziert werden.

Zu ihnen zählen:

- Phenolische Verbindungen wie einfache Phenole, Polyphenole, Xanthone, Phenylpropanoide, Stilbene und ihre Glykoside
- Isoprenoide Verbindungen: Terpene, Steroide und ihre Glykoside; Carotinoide, Speicherlipide
- Alkaloide: z. B. Koffein und Nikotin
- Aminosäuren wie Alliin oder Canavanin

3.2 Flavonoide

Die Gruppe der phenolischen sekundären Pflanzenmetabolite beinhaltet auch die Flavonoide und Isoflavonoide. Flavonoide verleihen praktisch allen farbigen Obst- und Gemüsearten ihre charakteristische Farbe. Daneben haben sie aufgrund ihrer Struktur noch verschiedene andere Wirkungen auf den Stoffwechsel speziell von Menschen und Tieren (Formica, 1995). Flavonoide im Allgemeinen sind für ihre antikanzerogenen, antiinflammatorischen und antioxidativen Eigenschaften bekannt und finden in der modernen Medizin ein immer breiter werdendes Anwendungsspektrum (Cowan, 1999). In dieser Arbeit soll speziell die antileukämische Aktivität der Flavonoide Curcumin und Quercetin untersucht werden.

3.2.1 Curcumin

Curcumin ist ein intensiv orange-gelber Farbstoff, der in natürlicher Form in der Gelbwurzel, auch als *Curcuma longa* bekannt, vorkommt und daher auch seinen Namen hat (Anto, 1996). Es ist jedoch auch synthetisch herstellbar. Curcumin findet weitreichende Verwendung als Lebensmittelzusatzstoff mit der Nummer E 100 zur Färbung von Nahrungsmitteln, z. B. bei der Herstellung von Konfitüre oder Teigwaren oder wird als Ersatz verwendet, um die Farbe von Safran in Gerichten vorzutäuschen. Darüber hinaus ist Curcumin auch Geschmacksträger der als Gewürz und Aromastoff verwendeten Gelbwurzel, die einen traditionellen und wesentlichen Bestandteil von Currypulver bildet und ihm seine gelbe Farbe verleiht (Anand, 2008b).

In der Medizin angewendet zeigt Curcumin antioxidative und entzündungshemmende Eigenschaften und zeigte in mehreren Studien an Tieren viel versprechende Ergebnisse gegen Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Alterserscheinungen. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass die Substanz die fortschreitende Demenz bei Alzheimer verlangsamen kann (Ahsan, 1999; Anto, 1996; Choudhuri, 2005). Darauf deuten auch Untersuchungen hin, nach denen in Indien, dem Stammland des Currys, sehr viel weniger Menschen an Alzheimer erkranken als in den westlichen Industrieländern. Interessant ist der gelbe Farbstoff auch in der Onkologie. So verhindert Curcumin die Bildung von Metastasen (Clinical Cancer Research 2005, 11, 7490-7498) und wird auch schon in klinischen Studien zur Behandlung verschiedener Krebsarten wie Darmkrebs, Pankreaskrebs oder Multiplen Myelom eingesetzt da es die Proliferation von Tumorzellen inhibiert und den Zellzyklus reguliert (Dhillon, 2008; Hsu, 2007). Auf primäre nicht entartete Zellen ist diese Wirkung jedoch nicht nachzuweisen. Dies macht Curcumin für die Krebsforschung besonders interessant, da es eine selektive Wirkung auf Tumorzellen zu haben scheint (Karunagaran, 2005). Besonders wirksam ist hierbei eine Kombination der Substanz mit dem Wirkstoff Paclitaxel, das gegenwärtig bereits zur Behandlung von Brustkrebs eingesetzt wird (Aggarwal, 2005). Curcumin verhindert *in vitro* in Zellkulturen das Wachstum von Tumorzellen bei schwarzem Hautkrebs durch die Inhibierung von NF- κ B (Shishodia, 2005). Die Signalwege, die von Curcumin beeinflusst werden sind so vielfältig wie seine Wirkungsweise. Z.B. werden der Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) Signalweg und die Zielgene des Transkriptionsfaktors Nukleären Faktor kappaB (NF- κ B), der die Expression antiapoptotischer Proteine wie bcl-2 reguliert durch Curcumin beeinflusst (Johnson, 2007). Auch die Apoptoseinduktion über TGF- β und der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) Signalweg, der sowohl Apoptose als auch Differenzierung von

Krebszellen reguliert, können durch Curcumin moduliert werden (Gaedeke, 2004; Haussler, 2008).

3.2.2 Quercetin

Das im Pflanzenreich weit verbreitete Quercetin (3, 30, 40, 5, 7-Pentahydroxyflavon) ist der in quantitativer Hinsicht bedeutendste Vertreter der Flavonoide. Es ist in vielen Obst- und Gemüsesorten wie Zwiebeln (284-486 mg/kg), Schnittlauch (245 mg/kg), Brombeeren (45 mg/kg) oder Äpfeln (20-70 mg/kg) zu finden. Die Aufnahme von Quercetin beträgt in den westlichen Ländern 25-30 mg/Tag (Hertog, 1993; Hertog, 1996). Quercetin ist ein Phytoöstrogen, also ein pflanzliches Hormon, und ist das bisher am besten untersuchte Flavonoid. Es ist auch in zahlreichen Arzneipflanzen wie z.B. *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum* (Johanniskraut), *Sambucus canadensis* (Holunder) u.v.a. zu finden und hat häufig erheblichen Anteil an der Heilwirkung dieser Pflanzen (Erlund, 2006). In Vergleichsstudien zur Wirksamkeit der Flavonoide wurde festgestellt, dass andere Vertreter dieser Substanzgruppe häufig ähnliche Wirkungen aufweisen wie Quercetin, es selbst aber in der Regel am stärksten wirksam ist (Formica, 1995). Quercetin schützt das Herz-Kreislauf-System, wirkt der Entstehung von Karzinomen und Ulzerationen entgegen, verhindert allergische Reaktionen und wirkt antioxidativ, antiviral und antiinflammatorisch (Hertog, 1996; Kuhar, 2006; Lee, 2003). In experimentellen Studien wurde nachgewiesen, dass Quercetin präventative und therapeutische Wirkungen auf Allergien (u.a. Heuschnupfen), Arteriosklerose, Augenkrankheiten, zu hohes Cholesterin und Krebsarten wie Magen-, Lungen-, Pankreas- und Brustkrebs zeigt (Murakami, 2008). Die Signalwege die Quercetin dabei beeinflusst sind sehr vielfältig. Quercetin inhibiert z.B. NF- κ B oder die Reverse Transkriptase von Retroviren (Williams, 2004). Für diese Arbeit sind vor allem die antikanzerogenen Eigenschaften und dabei durch Quercetin Behandlung modifizierten Signalwege von Interesse. Quercetin zeigt seine antikanzerogene Wirkung durch antiproliferative Eigenschaften und die Verstärkung der Wirkung von Chemotherapeutika (Murakami, 2008). Es inhibiert die Expression von Onkogenen wie H-ras, c-myc und K-ras und anti-Onkogenen wie p53 oder induziert die Expression von Zellzyklus regulierenden Proteinen wie p21 und p27 (Russo, 2003). Zusätzlich inhibiert Quercetin verschiedene Tyrosin- und Serin-Threonin Kinasen deren Aktivitäten wiederum Überlebens-Signalwege wie die MAPK-(Mitogen aktivierte Protein Kinase) Kaskade oder den AKT/PKB Signalweg beeinflussen (Kyaw, 2004). Quercetin zeigt einen Einfluss auf die Apoptose z.B. durch die

Inhibierung des NF- κ B Signalwegs (Murakami, 2008), die Induktion von TGF- β (Larocca, 1995) oder die Modulation des VDR Signalwegs (Rayalam, 2008). In Tiermodellen zeigte Quercetin wachstumshemmende und Apoptose hemmende Eigenschaften und eine klinische Studie der Phase I bestätigte, dass die Aufnahme von Quercetin (100 mg/Tag) und die daraus resultierende Plasmakonzentration die ausreichte um die Tyrosin Kinase Aktivität in Lymphozyten zu inhibieren (0,5 μ M), für den Menschen ungefährlich ist (Russo, 2003). Die Aufnahme von Quercetin aus natürlichen Quellen wie Zwiebeln und Äpfeln zeigte in epidemiologischen Studien eine Verringerung des Lungenkrebsrisikos, starke Effekte gegen Plattenepithelkarzinome, gesteigerte Resistenz gegen DNA Doppelstrangbrüche in Lymphozyten und eine verringerte Menge an oxidativ-toxischen Metaboliten im Urin (Von Low, 2007).

3.3 Das Indol Indirubin

Indole, oder auch Benzopyrrole sind heterozyklische Stickstoffverbindung mit jasminartigem Geruch, die in Mikroorganismen, Pilzen, Flechten, höheren Pflanzen und Tieren vorkommen und die aus der Aminosäure Tryptophan synthetisiert werden. Indolderivate finden sich in der Natur häufig, z. B. als Glucosid Indikan, aus dem im Altertum Indigo gewonnen wurde und werden häufig in der Parfümerie verwendet (Witulski, 2003). Aus der Gruppe der Indole ist für diese Arbeit das Indirubin bzw. seine wasserlösliche Form das Indirubin-3'-oxim von Bedeutung. Die Bezeichnung Indirubin tauchte erstmals 1855 auf. Isatan B, damals als Indican bezeichnet, wurde aus den Blättern des Färberwaides (*Isatis tinctoria*) isoliert und daraus Indirubin und Indigo gewonnen. Reines Indirubin wurde zum Färben von Textilien verwendet (Christie, 2007). Als wirksamer Bestandteil des natürlichen Indigos findet es auch seit Jahrhunderten Verwendung als Medikament, in der modernen Medizin wird es als Mittel gegen Krebs eingesetzt. Chronisch myeloische Leukämie (CML) wurde in China mit Danggui Longhui Wan behandelt, das aus zehn pflanzlichen Zutaten sowie Moschus besteht (Wang, 2008). Die antileukämische Eigenschaft konnte in einer Studie in den achtziger Jahren einem einzigen Inhaltsstoff, dem Indirubin, zugeschrieben werden das im natürlichen Indigo in Mengen zwischen 0,05 und 0,3 % enthalten ist (Hsu, 1980). Indirubin bewirkte eine komplette Remission in 26 % und eine teilweise Remission bei 33 % der Patienten (1979). Auch in getrocknetem Pflanzenmaterial der *Orchidaceae Calanthe discolor*, mit dem in der traditionellen chinesischen Medizin Entzündungen und bakterielle Infektionen behandelt werden, konnte Indirubin als Inhaltsstoff identifiziert werden (Yoshikawa, 1998). Zwar zeigt

es nur eine moderate Wirksamkeit, doch erregen seine im Vergleich zu anderen antileukämischen Mitteln sehr geringen Nebenwirkungen Interesse an seinem Wirkmechanismus, der ein anderer zu sein scheint als bei allen bis dato bekannten antileukämischen Wirkstoffen.

In Studien konnten bisher schon einige Wirkmechanismen von Indirubin aufgeklärt werden. So kann Indirubin CDKs direkt durch Anlagerung, aber auch indirekt durch die Aktivierung noch unbekannter Signalwege inhibieren und so den Zellzyklus blockieren, der essentiell für die Zellteilung ist (Hoessel, 1999). Indirubin kann auch die Apoptoseinduktion mittels TNF durch die Modulierung des NF- κ B Signalwegs verstärken (Sethi, 2006). Ein weiterer Wirkmechanismus von Indirubin ist die Hemmung des Stat3 Signalwegs. Stat (Englisch: signal transducers and activators of transcription) sind essentiell für die zelluläre Funktion und regulieren eine Reihe von Signalwegen, die für das Zellwachstum verantwortlich sind. Das Src (ein Gen das in ähnlicher Form im Sarcoma Virus vorkommt) Protein kann in mutierter Form als Onkogen eine Daueraktivierung von Stat3 bewirken, die durch Indirubin schon erfolgreich in Brust- und Prostatakrebs gehemmt wurde und in den Zellen Apoptose induzierte (Nam, 2005).

3.4 Pflanzeninhaltsstoffe und „functional food“

Wie aus der vorherigen Beschreibung über die sekundären Pflanzenmetabolite hervorgeht besitzen diese natürlich vorkommenden Substanzen ein großes Potential für die moderne Medizin. So können sie sowohl therapeutisch, aber auch präventiv angewendet werden (Gerhauser, 2003). Von den therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten wurde auszugsweise zuvor berichtet. Beispiele für die präventiven Anwendungen von Pflanzeninhaltsstoffen finden sich im sogenannten „functional food“. Hinter „functional food“ steht laut des Öko-Instituts in Freiburg die Idee Lebensmittel mit einem Zusatznutzen auszustatten und so den Genuss mit einer für die Gesundheit förderlichen Wirkung zu verbinden. Dieser Zusatznutzen besteht in der Verbesserung des individuellen Gesundheitszustandes bzw. in einer Verringerung des Risikos, an bestimmten Krankheiten zu erkranken (Hirahara, 2004).

In Japan, dem „Geburtsland des „functional food“ gibt es sogar rechtliche Bestimmungen zu Zusammensetzung und Funktion. Es müssen Nahrungsmittel (keine Kapseln, Tabletten oder Puder) sein, die auf Inhaltsstoffen natürlichen Ursprungs basieren und als Teil der täglichen Nahrungszufuhr aufgenommen werden sollten (Aoi, 2006). Unter anderem ist hier außerdem

festgelegt, dass „functional food“ zur Verbesserung der Immunabwehrfunktionen, Vorbeugung spezifischer Krankheiten, Unterstützung bei der Genesung bestimmter Krankheiten, Kontrolle von physischen und psychischen Beschwerden und Verlangsamung des Alterungsprozesses dienen soll. Die bereits erwähnten Flavonoide Curcumin und Quercetin finden beide bereits eine häufige Anwendung in „functional food“ und entfalten auf diesem Wege ihre präventative Wirkung gegen Krebs.

4. Der Arylhydrocarbon Rezeptor

4.1 Allgemeines

Im Jahr 1976 wurde der Arylhydrocarbon-Rezeptor (Ah-Rezeptor, AhR) von Poland und Mitarbeitern entdeckt (Poland, 1976). Der AhR ist ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor und gehört zur Familie der basic-Helix-Loop-Helix-Per-Arnt-Sim- (bHLH-PAS-) Proteine. Die PAS-Domäne ist charakteristisch für Proteine, die als „biologische Sensoren“ eine Rolle in der Detektion und Anpassung an Veränderungen der Umwelt spielen. Der AhR steuert die Reaktion auf die zelluläre Umgebung als Sensor für endogene, natürliche und xenobiotische niedermolekulare Substanzen (Carlson, 2002; Gu, 2000). Xenobiotisch bezeichnet einen der Biosphäre fremden, in der Regel durch menschliche Aktivitäten erzeugten und in die Umwelt gebrachten Stoff.

Der AhR reguliert durch seine Aktivierung in erster Linie die Expression fremdstoffmetabolisierender Enzyme der Phase 1 und 2 (Ciolino, 1999). Die Metabolisierung von niedermolekularen Fremdstoffen wird in drei Phasen unterteilt, wobei unterschiedliche Enzym-Gruppen benötigt werden. Die Cytochrom P450-Familie vermittelt die 1. Phase der Transformation durch Oxidation oder Reduktion des Fremdstoffes (Vrzal, 2004). Zielgene des AhR aus dieser Gruppe sind Cyp1a1 (Cytochrom P4501a1), Cyp1b1 und Cyp1a2. Das durch die Cyp-Enzyme polarisierte Produkt wird in Phase 2 mittels Transferasen (z.B. Glutathion-S-Transferase und Sulphotransferase) mit weiteren reaktiven Molekülen konjugiert (Vrzal, 2004) wobei hier hauptsächlich die Glucuronyltransferase UGT-1A6, Aldehyd-3-Dehydrogenase und die Glutathion-S-Transferase GST-A1 vom AhR reguliert werden (Kondraganti, 2005). In der 3. Phase wird der Transport des Metabolits aus der Zelle reguliert (Deml, 1996).

4.2 Die Aktivierung des AhR Signalwegs

Der AhR liegt in nicht aktivierter Form assoziiert mit einem molekularen Chaperon Komplex im Zytoplasma vor. Zwei Heatshock Proteine 90 (Hsp90), sowie das AhR interagierende Protein (AIP oder auch Xap2 (Hepatitis B Virus X-assoziertes Protein 2) genannt) und das Ko-Chaperon p23 stabilisieren den AhR. Der so im Zytoplasma vorliegende AhR wird durch die Bindung eines Liganden aktiviert und transloziert in den Zellkern (Abb. 3). Nach der Aktivierung des AhR durch einen Liganden dissoziiert der AhR-Ligand-Komplex vom Chaperon-Komplex und bildet im Zellkern ein Heterodimer mit dem AhR Nuklear Translocator (Arnt), der ebenfalls ein Mitglied der PAS-Familie ist. Es ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt, ob der AhR-Ligand-Chaperon-Komplex noch im Zytoplasma oder erst im Zellkern dissoziiert. Das Heterodimer aus dem AhR und Arnt das den Liganden gebunden hält bildet den funktionellen Transkriptionsfaktor, welcher an einen bestimmten Sequenzbereich im Promoter, das so genannte Xenobiotisch responsive Element (XRE) bindet und damit die Expression des entsprechenden Gens reguliert (Denison, 2002). Ein XRE besteht aus einer Kernsequenz mit der Basenfolge 5'-GCGTG-3' und flankierenden Regionen aus jeweils 7 Basen (Sun, 2004; Yao, 1992). Je stärker diese Kernsequenz konserviert ist, desto höher ist die Affinität des AhR-Arnt Heterodimers zum Promoter. Hierbei korrelieren sowohl wenige gut konservierte, als auch eine Vielzahl an schlechter konservierten, „schwächeren“ XREs mit einer hohen Wahrscheinlichkeit der Bindung des Transkriptionsfaktors an den Promotor. Wie genau diese Verhältnisse sind und warum auch Gene ohne XRE vom AhR beeinflusst werden, ist bisher nicht vollständig geklärt. Die Aktivierung des AhR und die Bindung des AhR-Arnt Heterodimers an ein XRE kann sowohl zur Induktion, als auch zur Inhibierung bestimmter Gene durch die Interaktion zwischen verschiedenen Transkriptionsfaktoren führen (Frericks, 2008). Vor einigen Jahren konnte ein weiteres Mitglied der AhR-Signalkaskade identifiziert werden, der AhR Repressor (AhRR). Der AhRR kann alternativ zu Arnt mit dem AhR dimerisieren, jedoch kann dieser Komplex nicht an die DNA binden. Der AhR wird somit also abgefangen und die durch ihn gesteuerte Genexpression inhibiert. Der AhRR ist selbst ein Zielgen des AhR und fungiert somit als regulatorischer Feedback Kreis.

Das Molekulargewicht und die Bindungsaffinität zum AhR variieren zwischen den Spezies. Es finden sich Molekulargewichte von 95 kD (C57BL/6-Mauslinien), 104 kD (Kaninchen), 124 kD (Hamster) bis 130 kD (Wildmaus) (Poland, 1987). Zudem wurden in Mäusen vier und

in humanen Zelllinien zwei distinkte Ah-Rezeptorformen mit unterschiedlichen Ligand-Bindungsaffinitäten detektiert (Perdew, 1995).

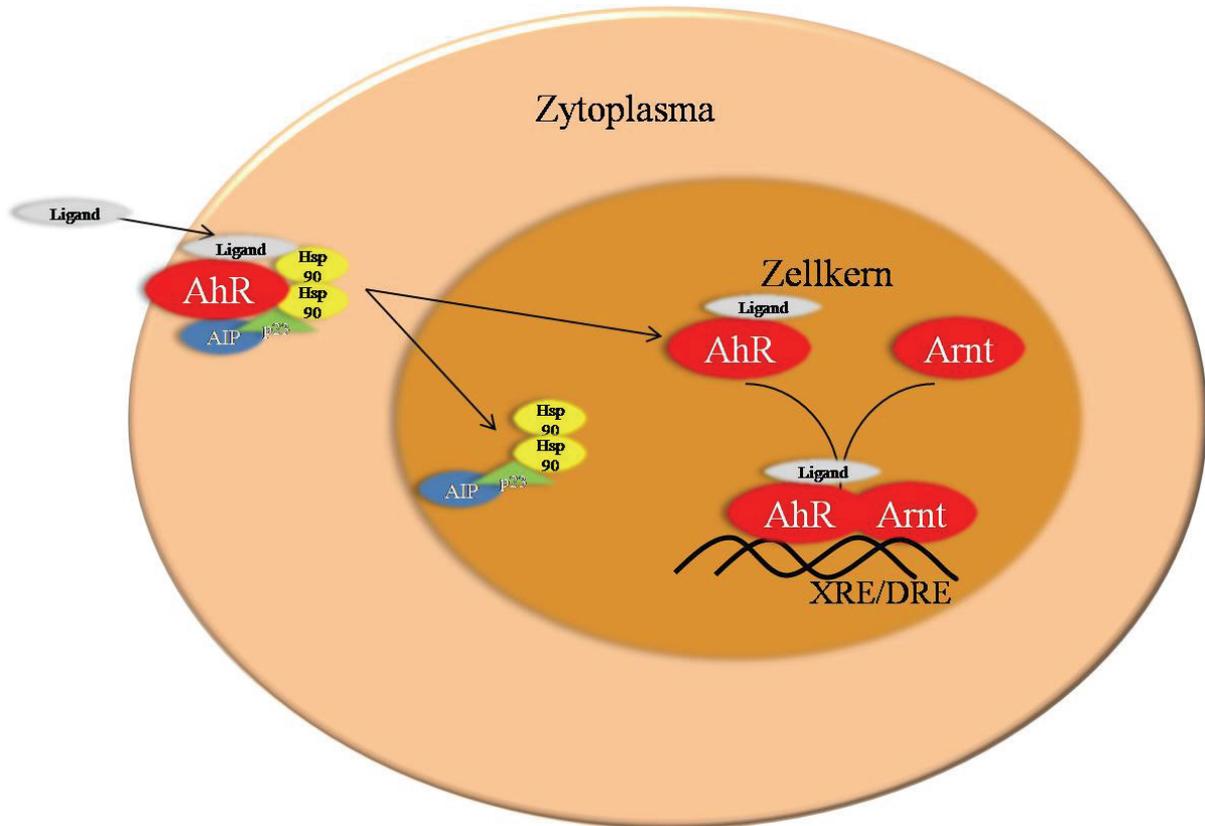


Abb. 3: Schema des AhR-Signalwegs (modifiziert nach www.biocarta.com).

4.3 Liganden des AhR

Zu den Liganden des AhR gehören planare Aromaten und halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe wie polychlorierte Dibenzodioxine und Dibenzofurane, oder polychlorierte und polybromierte Biphenyle und nicht halogenierte polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe. Ihnen ist gemein das es sich immer um planare, aromatische und lipophile Substanzen mit einer maximale Größe von 14 Å x 12 Å x 5 Å handelt. Verbindungen mit der höchsten Affinität zum AhR weisen hierbei die höchste Toxizität auf (Knutson, 1982; Safe, 1995; Whitlock, Jr., 1989). Der am besten untersuchte und bekannteste Ligand des AhR ist 2,3,7,8- Tetrachlordibenzo-p-Dioxin (TCDD, Abb. 4 D) (Safe, 1995). Ein physiologischer Ligand des AhR konnte bis jetzt noch nicht eindeutig identifiziert werden. 2001 identifizierte man im Urin die beiden Substanzen Indirubin (Abb. 4 A) und Indigo, die

eine höhere Affinität als TCDD zum AhR aufweisen (Adachi, 2001). Liganden des AhR können aus den verschiedensten Stoffgruppen stammen. Wie erwähnt kann der AhR sowohl durch natürliche, als auch durch xenobiotische Substanzen aktiviert werden. Zu den Xenobiotika zählen z.B. das TCDD, das bei nicht-kompletten Verbrennungsprozessen entsteht (Fiedler, 1996), das Benz(a)pyren oder auch das 3-Methylcholanthren (Tamaki, 2004). Natürlich vorkommende Liganden des AhR sind z.B. die körpereigenen Bilirubin und Indirubin (Peter, 2004), verschiedenste Tryptophanderivate wie 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ) oder Indigo (Rannug, 1995), oder auch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie die Flavonoide Curcumin und Quercetin (Abb. 4 B und C) (Zhang, 2003b).

Liganden, die den AhR Signalweg aktivieren (siehe 4.2) werden auch als Agonisten des AhR bezeichnet. Liganden des AhR können jedoch auch bewirken, dass der AhR Signalweg blockiert wird. In diesem Fall spricht man von Antagonisten des AhR. Beispiele hierfür sind 3-Methoxy-4-nitroflavon (MNF) und α -Naphthoflavon (α NF). Die Mechanismen, über die eine Substanz als Antagonist wirkt, sind bisher noch nicht ausreichend untersucht, und es gibt diesbezüglich verschiedene Möglichkeiten. So könnte der Antagonist nach seiner Bindung an den AhR dessen Translokation in den Kern verhindern, oder die Dissoziation der Chaperone wie Hsp90 vom AhR blockieren. Für die Wirkung von MNF wird der zweite Fall vermutet (Henry, 1999). Weitere Mechanismen könnten die Verhinderung der Dimerisierung vom AhR mit Arnt oder eine Verhinderung der Bindung an das XRE sein. Ob ein AhR-Ligand als Agonist oder Antagonist wirkt, ist oft abhängig von der eingesetzten Konzentration, ein Beispiel hierfür ist α -Naphthoflavon (Nazarenko, 2001). Ferner kann die Wirkung eines AhR-Liganden vom untersuchten Zelltyp abhängen (Zhang, 2003a). Aus der Gruppe der Flavonoide sind z.B. Quercetin, Kaempferol (Ciolino, 1999), Curcumin (Abb. 2 C) (Ciolino, 1998), Chrysin und Genistein (Moon, 2006) als Liganden des AhR beschrieben. Zwei dieser natürlich vorkommenden AhR Liganden nämlich Curcumin und Quercetin sollen in dieser Arbeit genauer auf die Wirkung die sie über den AhR vermitteln untersucht werden.

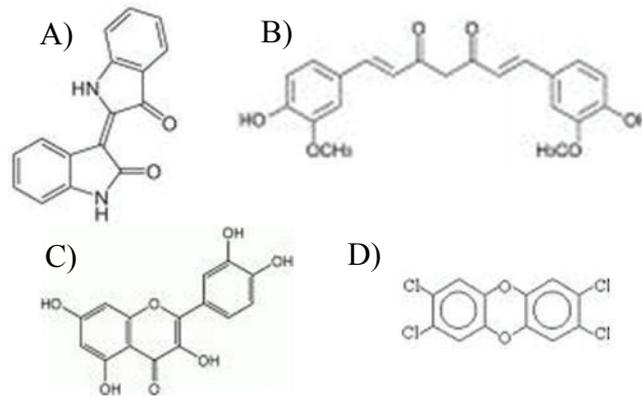


Abb. 4: Die AhR Liganden Indirubin (A), Curcumin (B), Quercetin (C) und TCDD (D).

4.4 Beteiligung des AhR an anderen Signalwegen

Abgesehen von der metabolischen Regulierung wurde für den AhR auch die Beteiligung an anderen Signalwegen beschrieben (Beischlag, 2008). Der AhR kann sowohl durch exogene Liganden aktiviert, als auch in Abwesenheit von exogenen Liganden an physiologischen Prozessen beteiligt sein (Barouki, 2007). So sind für den AhR Tumor promovierende als auch inhibierende Effekte durch Einfluss auf den Zellzyklus und die Regulierung der Apoptose beschrieben (Safe, 1999). Als Zielgene des AhR wurden in diesem Zusammenhang z.B. die Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 identifiziert. Elferink beschreibt in seiner Arbeit eine Interaktion des AhR mit dem Retinoblastoma Protein (Rb), das als Motor des Zellzyklus beschrieben wird (Elferink, 2003). Der NF- κ B Signalweg der eine Rolle in der Mitochondrien vermittelten Apoptoseregulierung durch die bcl-2 Protein Familie spielt wird vom AhR in unterschiedlichen Zellsystemen beeinflusst (Cilloni, 2007). Hierbei wird zum einen eine Inhibierung zum anderen eine Interaktion mit den Untereinheiten von NF- κ B wie RelB beschrieben. Das proapoptotische bax, ein Mitglied der bcl-2 Protein Familie wurde in Maus Oozyten AhR abhängig exprimiert (Matikainen, 2001). Der AhR kann außerdem noch an Proliferation, Differenzierung oder der Aufrechterhaltung der Leber- und Immunsystemhomeostase mitwirken und zeigt Interaktionen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1, oder dem ER (Frericks, 2008; Puga, 2005).

4.5 Der AhR und ausgewählte Pflanzeninhaltsstoffe

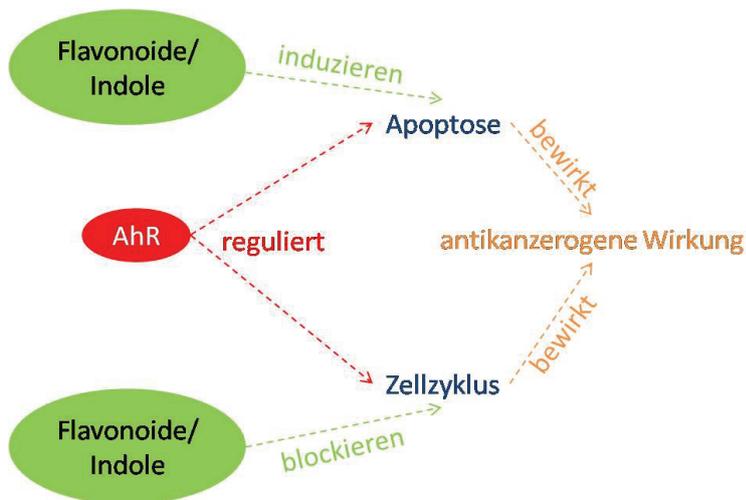
Pflanzeninhaltsstoffe enthalten eine Reihe an AhR Liganden aus den Gruppen der Flavonoide und Indole. Substanzen dieser beiden Stoffgruppen treten auch in therapeutischen Ansätzen

und Behandlungen von Krankheiten aber auch im „functional food“ häufig auf (Von Low, 2007). Zu ihnen zählen auch Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin. Curcumin kann den AhR aktivieren und phosphorylieren und bewirkt eine Reduzierung der Aktivierung des AhR durch TCDD oder B(a)P (Ciolino, 1998). Indirubin-3'-oxim kann den AhR und die von ihm kontrollierten fremdstoffmetabolisierenden Enzyme ebenfalls aktivieren bzw. induzieren (Adachi, 2001). Quercetin zeigt eine Aktivierung des AhR und zusätzlich einen antagonistischen Einfluss auf toxische Effekte, die über den AhR durch andere Liganden vermittelt werden, durch Veränderung der Expression von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen (Ciolino, 1999). Diese natürlich vorkommenden Liganden sind im Zusammenhang mit dem AhR bisher hauptsächlich nur auf ihren Einfluss auf den Fremdstoffmetabolismus genauer untersucht worden. Wie zuvor erwähnt, ist für den AhR jedoch auch die Beteiligung an anderen Signalwegen gezeigt worden. Dem AhR könnte also als Rezeptor exogen zugeführter natürlicher Substanzen eine wichtige Rolle in der Entfaltung ihrer Wirkung durch Metabolisierung aber auch durch Weiterleitung von Signalen wie der Induktion der Apoptose oder der Regulierung des Zellzyklus zukommen. Die Flexibilität des AhR und die Tatsache, dass er Naturstoffe binden kann macht ihn zu einem interessanten Ziel in der Tumorforschung, da er in entarteten Zellen möglicherweise anders reagiert als in gesunden Zellen und so einen Ansatzpunkt zur differenzierten Behandlung von gesunden und kranken Zellen bietet.

5. Fragestellung

Bisherige Arbeiten konnten zeigen, dass der AhR in der Tumorentwicklung eine Rolle spielt. Es ist außerdem bekannt, dass natürliche AhR Liganden antiproliferativ auf Tumorzellen wirken und dabei die als Zielgene des AhR beschriebenen Gene wie p21, p27 oder bax regulieren. Diese Gene sind Bestandteil der Apoptose- und Zellzyklusregulation und somit potentielle Zielgene bei der Krebstherapie. Die natürlichen AhR Liganden Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin sind sowohl therapeutisch, als auch als Bestandteile von Lebensmitteln und speziell von „functional food“ präventiv gegen Krebs einsetzbar (Abb. 5 A). Die Tatsache, dass der AhR auch andere Signalwege wie die Apoptose oder den Zellzyklus beeinflusst führt zu der Frage, in wie weit die antiproliferativen und proapoptischen Eigenschaften natürlicher AhR Liganden wie Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin über den AhR Signalweg reguliert werden (Abb. 5 B).

A)



B)

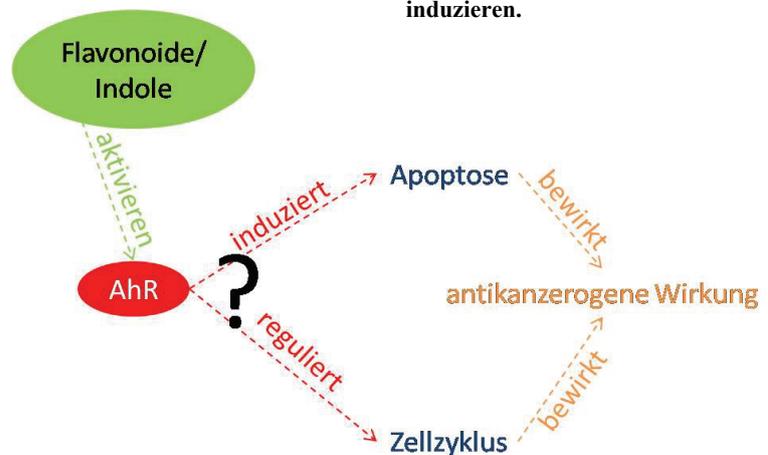


Abb. 5: A) Sowohl der AhR, als auch Flavonoide und Indole beeinflussen die Apoptose und den Zellzyklus und führen zu einer antikanzerogenen Wirkung. B) Einige Flavonoide und Indole sind Liganden des AhR und könnten ihre antikanzerogene Wirkung potentiell über den AhR induzieren.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die drei AhR Liganden Curcumin Indirubin-3'-oxim und Quercetin in der AML Zelllinie HL-60 durch Induktion der Apoptose, Regulation des Zellzyklus oder Einfluss auf den ROS-Gehalt antileukämisch wirken. Durch Blockierung des AhR Signalwegs sollte die Art und der Umfang der Rolle die der AhR bei der antileukämischen Wirkung der zwei Flavonoide Curcumin und Quercetin und dem Indol Indirubin-3'-oxim einnimmt aufgeklärt werden.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 AhR Agonisten / Antagonisten

Die AhR Liganden Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin sowie der AhR Antagonist α -Naphthoflavin wurden von Sigma, Deisenhofen bezogen. Der AhR Antagonist MNF wurde freundlicherweise von Frau Dr. Ellen Fritsche (IUF, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. TCDD wurde von LGC Promochem (Wesel) bezogen.

1.2 Feinchemikalien und Verbrauchsmaterial

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von Sigma, Deisenhofen bezogen.

Aqua dest.	Hauseigene Reinstwasseranlage, TKA-LAB
Dinatriumphosphat [Na_2HPO_4]	Merck, Darmstadt
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, vergällt und unvergällt	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat [KH_2PO_4]	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid [NaCl]	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid [KCl]	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid [NaOH]	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid [NH_4Cl]	Carl Roth, Karlsruhe
Tris	Carl Roth, Karlsruhe

Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden von Greiner (Frickhausen) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

1.3 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme für molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von Sigma, Deisenhofen bezogen.

Agarose	Peqlab, Erlangen
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
DNA-Längenstandard, 100 Bp-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
DNase I (RNase frei)	Invitrogen, Karlsruhe
25 mM EDTA	Fermentas, St. Leon-Roth
dNTP, 10 mM	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
MMLV Reverse Transkriptase (200 U/ μ l), 5x Reaktionspuffer	Promega, Mannheim
100 mM DTT	Promega, Mannheim
RNase Inhibitor (RNase out, 40 U/ μ l)	Invitrogen, Karlsruhe
Ponceau S Lösung	Pierce, Rockford, USA

1.4 Puffer und Medien

Zellkulturmedium

500 ml RPMI (PAA Laboratories, Cölbe)

50 ml Fötale Kälberserum (PAA Laboratories)

Antibiotika: 100 U/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin (PAA Laboratories)

Alle Puffer wurden steril filtriert oder autoklaviert und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH 7,4

140 mM NaCl

2 mM KCl

1, 5 mM KH_2PO_4

8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

FACS-Puffer

140 mM NaCl

4 mM KCl

2 mM KH_2PO_4

20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

0,7 mM EDTA

Diethylpyrocarbonat (DEPC) Wasser

4 ml DEPC wurden auf 2 l Wasser gegeben und über Nacht gerührt. Danach wurde die Lösung autoklaviert und aliquotiert.

Tris-Acetat-EDTA-Pufferlösung (TAE), pH 8,0

2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

40 mM Tris

20 mM Eisessig

Agarosegel 1%

0,4 g Agarose in 40 ml TAE-Puffer

Die Agarose wurde durch Kochen gelöst, der Lösung wurde 1 µl einer Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zugefügt.

Agarosegel-Probenpuffer

50 % (v/v) Glycerin

0,01 % (w/v) Bromphenolblau in TAE

Laemmli Puffer

125mM Tris HCl, pH6,8

10 % Glycerin

4 % SDS

0,01 % Bromphenolblau

5 % β-Mercaptoethanol

Acrylamidgel-Reservoirpuffer

1,44 % Glycin

3 % Tris

0,1 % SDS

Acrylamid-Trenngel

25 % 1,5 M Tris HCl pH 8,8

10 % Acrylamid

0,04 % APS

0,03 % TEMED

Acrylamid-Sammelgel

25 % 1,5 M Tris HCl pH 6,8

6 % Acrylamid

0,1 % APS

0,1 % TEMED

Blotting Puffer

20 mM Tris HCl pH 8,0

150 mM Glycin

20 % (v/v) Ethanol

1x TBST

150 mM NaCl

10 mM Tris HCl, pH 7, 5

0, 1 % (v/v) Tween 20

MTT-Lyse Puffer

20 ml DMSO

2 g SDS

120 µl Eisessig

1.5 Oligonukleotide (Primer)

Intronüberspannende Oligonukleotide wurden mit dem Programm *Primer 3* entworfen und von Operon Biotechnologies GmbH, Köln synthetisiert.

Tabelle 1: Sequenzen der in der PCR eingesetzten Primer

Gen	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Annealing-temp. [°C]	Produkt-Größe [Bp]
Hprt	gta atg atc agt caa cgg ggg ac	cag caa gct tgc aac ctt aac ca	56	190
AhR	tgg tct ccc cca gac agt ag	ttc att gcc aga aaa cca ga	55	132
Arnt	tta ttt gcc cag gat aga ga	caa act ggg aag tac gag tc	55	355
AhRR	cgt gga ctc cct tta atc ca	ttc acc cgg agg taa ctg ac	58	293
Cyp1a1	aag atg gtc aag gag cac ta	ggg ttc atc acc aaa tac at	56	221
Bcl-2	cag gca gct gca cct ga	ccc agc ctc cgt tat cc	56	239
Bcl-xl	cat caa tgg caa ccc atc ctg	tgt tcc cgt aga gat cca caa aag	56	437
Bax	ttc tga cgg caa ctt caa ctg g	gag gaa gtc caa tgt cca gc	56	133
Bad	cca gat ccc aga gtt tga gc	cca cca gga ctg gaa gac tc	56	460
p21	acc ttc cag ctc ctg taa cat act	gtc tag gtg gag aaa cgg gaa	56	84
p27	agg aca cgc att tgg tgg a	tag aag aat cgt cgg ttg cag gt	56	108
HO-1	gtg ata gaa gag gcc aag act g	acc aga aag ctg agt gta agg a	56	239
Vegf	gga ttc gcc att tta ttt ttc ttg	gta tgt atg tgg gtg ggt gtg tct	56	102
VDR	gcc cac cat aag acc tac ga	aga ttg gag aag ctg gac ga	60	203
Tgfb	cac gtg gag ctg tac cag aa	gaa ccc gtt gat gtc cac tt	60	219
RelB	gct cta ctt gct ctg cga ca	agg tac gtg aaa ggc aat gg	56	234
Anxa2	cca gga gct gca gga aat ta	atg ctg atc cac ttg gga ac	60	237
Gspt1	cgt aga tgc tgg caa gtc aa	caa aat agg cac gac cca ct	56	197
Prtn3	tgg ctc agg tgt ttc tga ac	gtg acc acg gtg aca ttg ag	56	232
S100A8	atg ccg tct aca ggg atg ac	acg ccc atc ttt atc acc ag	60	160
CyclinD3	tga cca tgc aaa aac tgt gc	aca gag ggc caa aaa ggt ct	60	212

Alle Oligonukleotide wurden mit Aqua bidest. auf 100 µM verdünnt und bei -20°C gelagert.

1.6 Plasmide, si- und shRNA

1.6.1 Plasmid zur Expression des AhR-GFP Fusionsproteins

Das Plasmid „pEGFPmAhR“ für die Expression des AhR-GFP Fusionsproteins wurde freundlicherweise von Frau Dr. Ellen Fritsche (IUF, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt und war zuvor durch Susanne Donat im Rahmen ihrer Dissertation aus dem pCMS-EGFP Vektor (Clonotech, Mountain View, USA) generiert worden.

1.6.2 Plasmide zur Expression von shRNA

Die Plasmide für die Transduktion zur Expression von shRNA wurden freundlicherweise von Frau Dr. Ellen Fritsche (IUF, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt:

AhR-shRNA Plasmid	pCL1N.THPC AhR (1.4) NEO
Plasmid für unspezifische shRNA	pCL1N.THPC shRNA (1.3) NEO
Plasmid ohne shRNA	pCL1N.THPC NEO

1.6.3 siRNA

Die siRNA als Gemisch aus vier verschiedenen Sense- und Antisensesträngen (SMARTpool) von Dharmacon wurde über Perbio (Bonn) bezogen. Als Kontrollen dienten eine Nonsense siRNA („siControl Non-Targeting siRNA #3“, D-001210-03-20) und eine Lamin siRNA („siGLO LAMIN A/C – Human“, D001620-02-05) Die genauen Bezeichnungen und Sequenzen für die AhR siRNA lauteten:

Tabelle 2: AhR si RNA Sequenzen: „siGenome SMARTpool M004990-00-005 Human AhR, NM_001621“

Sequenzname	Sense Sequenz	Antisense Sequenz
SMARTpool duplex (1) D-004990-01, AhR	gaa cag agc auu uac gaa auu	uuu cgu aaa ugc ucu guu cuu
SMARTpool duplex (2) D-004990-02, AhR	gaa agu ggc aug aua guu uuu	aaa cua uca ugc cac uuu cuu
SMARTpool duplex (3) D-004990-03, AhR	gca agu uaa ugg cau guu uuu	aaa cau gcc auu aac uug cuu
SMARTpool duplex (4) D-004990-04, AhR	gcu cug aac uca agc ugu auu	uac agc uug agu uca gag cuu

1.7 Antikörper

1.7.1 Antikörper zur Immunhistochemische Färbung

Arylhydrocarbon Rezeptor Antikörper [RPT9] Abkam, Cambridge, England

Ziege anti-Maus IgG, F(ab')₂ Fragment spezifisch

FITC-gekoppelt Jackson ImmunoResearch
West Grove, PA, USA

1.7.2 Antikörper für Western Blot

Maus anti-Lamin A / C monoklonaler Antikörper BD-Bioscience, Franklin Lakes,
NJ USA

Maus anti-AhR Antikörper (C-4) Santa Cruz Biotechnology, Santa
Cruz CA, U.S.A.

Ziege anti-Maus IgG, F(ab')₂ Fragment spezifisch

Hrp-gekoppelt Jackson ImmunoResearch
West Grove, PA, USA

1.8 Software

GraphPad Prism 4.0 GraphPad, San Diego, CA, USA

Office 2000 Microsoft, Redmond, WA, USA

WinMDI 2.8 The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA

Cell Quest 3.3 BDBioscience, Heidelberg

Primer3 Whitehead Institute for Biomedical Research;
Steve Rozen, Helen J. Skaletsky (1998)

Corbett Analysis Software 6.1 Corbett, LTF Labortechnik, Wasserburg

2. Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Zellkultur

HL-60 Zellen wurden in RPMI Medium mit Zusatz von 10 % FCS und je 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptavidin bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Alle drei Tage wurden die Zellen geerntet und für die jeweiligen Experimente verwendet.

2.1.2 ROS- Messung

5x10⁶ Zellen/ml wurden in 2 ml Medium ausgesät und nach der Behandlung zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 10 µM von 2',7'-Dichlordihydro-fluorescein-Diacetat (DCFH-DA) wurden die Zellen für 20 min bei 37°C im dunklen inkubiert. Das DCFH-DA diffundiert durch die Zellmembranen und wird durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert. Das DCFH-DA fluoresziert nicht, reagiert aber insbesondere mit H₂O₂ in Gegenwart von Peroxidasen zum fluoreszierenden 2',7'-Dichlorfluorescein (DCF) umgesetzt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde der Anstieg der Fluoreszenz in den Zellen mit einem Durchflusszytometer (FACSCalibur, BD-Bioscience, Franklin Lakes, NJ USA) gemessen und als Maß für die ROS-abhängige Oxidation von DCFH-DA zu DCF genommen.

2.1.3 Messung des Mitochondrien Membranpotentials

5x10⁶ Zellen/ ml wurden in 2 ml Volumen ausgesät und nach der Behandlung zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 10 µM des Detektionsstoffes Tetramethylrhodamin-methylester (TMRM) wurden die Zellen 20 min bei 37°C im dunklen inkubiert. Aufgrund seiner positiven Ladung akkumuliert sich TMRM in den negativ geladenen Mitochondrien. Bei einer Depolarisation der Mitochondrien (z. B. zu Beginn der Apoptose) werden dort gespeicherte Anionen freigesetzt, woraufhin die TMRM Konzentration dort ebenfalls sinkt. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurde die Änderung der Fluoreszenz in den Zellen mit einem Durchflusszytometer (FACSCalibur, BD) gemessen und als Maß für das Membranpotential der Mitochondrien genommen.

2.1.4 Zellzyklusmessung

Der DNA-Gehalt der Zelle ist in jeder Phase des Zellzyklus unterschiedlich: In der G₁-Phase besitzen Zellen den normalen Chromosomensatz, in der S-Phase wird die DNA verdoppelt und steigt linear an bis zur G₂/M-Phase in der der Chromosomensatz kurz vor der Zellteilung doppelt vorliegt. Durch Anfärben der DNA mit interkalierendem Propidium Iodid (PI) kann die Menge der DNA pro Zelle im Durchflusszytometer bestimmt werden. Um akkumulierte Zellen, sogenannte Dubletten und Quadrupel, aus der Messung auszuschließen, wurde das Verhältnis aus Peak-Fläche (FL-2A) und Peak-Breite (FL-2W) dargestellt und der Bereich der Einzelzellen (blau) für die Messung ausgewählt:

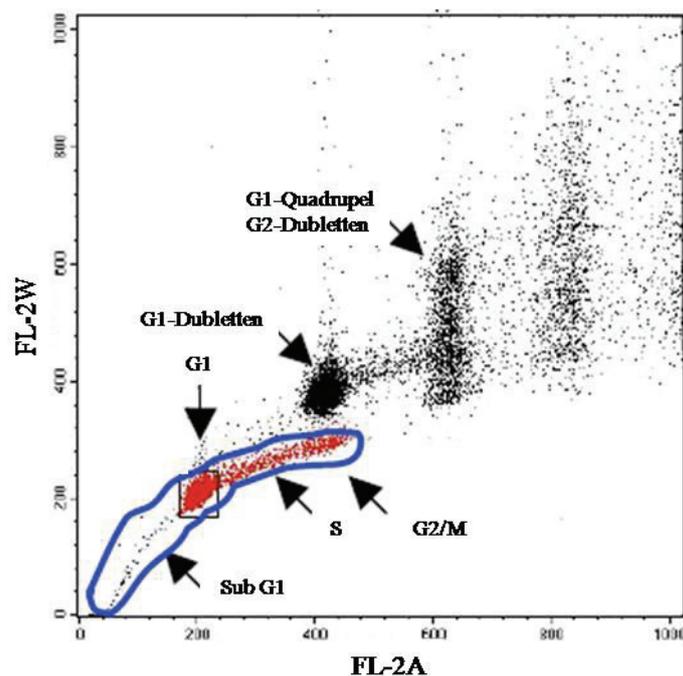


Abb. 6: Darstellung des Verhältnisses aus Peak-Fläche (FL-2A) und Peak-Breite (FL-2W) der PI-Messung zum Ausschluss akkumulierte Zellen wie Dubletten und Quadrupel. Der Bereich der Einzelzellen, der für die Messung ausgewählt wurde, ist blau dargestellt. Die Pfeile zeigen die sich in den einzelnen Phasen des Zellzyklus befindenden Zellpopulationen, sowie die ausgeschlossenen Dubletten und Quadrupel.

G₁-Dubletten haben denselben DNA-Gehalt, wie Zellen in G₂, brauchen aber länger, um durch den Laserfokus zu kommen, somit ergeben sich breitere Peaks und ein größeres FL-2W-Signal.

5x10⁶ Zellen/ml wurden in 2 ml Medium ausgesät und nach der Behandlung zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in eiskaltem 70 %igen Ethanol bei 4°C für 1h fixiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen in PBS wurde die RNA durch Zugabe von RNase (10µg/ml) in PBS bei 37°C für 30 min abgebaut um die Hintergrundfärbung mit RNA

zu minimieren. Erneutem Waschen mit PBS folgte die Inkubation mit 1 µg/ml Propidium Iodid (PI) in PBS bei RT im Dunkeln für 15 min. Das interkalierte Propidium Iodid kann bei 617 nm Wellenlänge im Durchflusszytometer gemessen werden.

2.1.5 Caspase Assay

Um die Aktivitäten der Caspasen nach der Behandlung der Zellen messen zu können, wurde der Caspase-Glo® Assay von Promega durchgeführt. Hierbei katalysieren die aktiven Caspasen spezifisch eine Reaktion von einem Substrat in ein lumineszierendes Produkt, welches am Luminometer detektiert werden kann. Je höher die Caspaseaktivität, desto höher die emittierte Lumineszenz.

5×10^6 Zellen/ml wurden in 100 µl/well in einer 96 well Platte ausgesät. Nach Behandlung der Zellen wurde der Caspase Assay laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung der Lumineszenzsignale erfolgte an einem MICRO LUMAT Plus LB96V Luminometer (PerkinElmer, Regensdorf, Schweiz).

2.1.6 MTT-Viabilitäts Assay

Mit dem MTT-Assay ist eine kolorimetrische Messung lebender Zellen aufgrund ihrer Stoffwechselaktivität in Korrelation zur Zellzahl möglich. Stoffwechselaktive Zellen reduzieren mit ihrer NADH-abhängigen Succinatdehydrogenase (SDH) der Mitochondrien das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid) zu einem blauvioletten unlöslichen Formazanprodukt. Die Menge des gebildeten Formazans steht in direkter Beziehung zur Anzahl lebender Zellen. Durch Zugabe von DMSO werden die Zellen lysiert, das gebildete Formazan wird dabei gelöst und kann spektralphotometrisch bei 570 nm gemessen werden.

5×10^6 Zellen/ml wurden in 100 µl Medium/well in einer 96-well Platte ausgesät. Nach der jeweiligen Behandlung wurden je 10 µl MTT-Lösung (5 mg/ml) in jede Vertiefung gegeben und die Platten bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Platten für 8 min bei 400 g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Durch Zugabe von 100 µl MTT-Lysepuffer wurden die Zellen lysiert und das gebildete Formazanprodukt gelöst. Um die letzten Aggregate zu lösen und eine homogene Lösung zu

erhalten, wurden die Platten für 5 min bei 400 rpm auf einem Microtiterplatten-Schüttler (Eppendorf, Hamburg) geschüttelt und anschließend in einem Microtiterplatten-Photometer vermessen.

2.1.7 Immunhistochemische Färbung

Die Zellen wurden für 20 min mit 1 μ M Hoechst 33342 in Medium im Dunkeln bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert um die Kerne für die Fluoreszenzmikroskopie anzufärben. 3×10^5 Zellen in maximal 200 μ l Medium wurden mit dem Cytospin III (Shandon, Berlin) auf einen Objektträger für 5 min bei 100 g zentrifugiert. Die aufzentrifugierten Zellen wurden für 5 min in eiskaltem Methanol und 2 min in eiskaltem Aceton bei -20°C fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Objektträger für 1h bei RT in einer feuchten Kammer mit dem AhR Antikörper RPT 9 inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min in PBS wurde mit dem spezifischen Zweitantikörper für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Auswertung der Färbung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop.

2.1.8 Transfektion mit Amaxa

Das Einbringen von (Plasmid-) DNA oder (si-) RNA in die Zelle erfolgte mit dem Nucleofector I (Amaxa, Köln). Diese Technik beruht auf der Kombination von Elektroporation mit einem speziellen (geschütztem) Transfektionspuffer, der den Elektroporationsvorgang optimiert und die Nukleinsäure direkt in den Kern transfiziert.

3×10^6 Zellen wurden in 100 μ l Transfektionspuffer nach Angaben des Herstellers transfiziert und 24 bzw. 48 h nach der Transfektion für Experimente eingesetzt.

2.1.8.1 Transfektion von siRNA

Um selektiv Gene für eine begrenzte Zeit herunter zu regulieren wurde die Transfektion mit siRNA (Englisch: small interfering RNA, kleine eingreifende RNA) angewendet. Die kleinen Teilstücke von ca. 20 Basenpaaren werden von einem RNA-induced-silencingcomplex (RISC) gebunden, in ihm wird ein Strang der doppelsträngigen siRNA abgespalten wodurch RISC aktiviert wird. RISC bindet an die mRNA, deren Sequenz komplementär ist zu der im RISC gebundenen einsträngigen siRNA. Die Ziel-mRNA wird gespalten und ist somit dem

Abbau in der Zelle schutzlos ausgeliefert. Ein RISC Komplex mit einer siRNA ist in der Lage den Verdau mehrerer mRNA-Moleküle zu bedingen, d.h. das Signal zum mRNA-Verdau wird amplifiziert. Als komplementäre Sequenzen zur Ziel-mRNA wurden die siGENOME SMARTpools für den menschlichen AhR, menschliches Lamin, sowie als Negativkontrolle eine unspezifische siRNA von Dharmacon (Perbio, Bonn) eingesetzt. Die Transfektion erfolgte mit Amaxa wie unter 2.1.5 beschrieben. Aufgrund der Halbwertszeiten der Proteine von 28 h für den AhR (Ma, 2000) und 12 h für Lamin A/C (Banaszynski, 2006) wurden die Experimente 48 h nach der Transfektion durchgeführt.

2.1.8.2 Transfektion von DNA

Um die Aktivierung und Translokation des AhR in den Kern von HL-60 Zellen nachzuweisen, wurden ein Plasmid (pCMS-EGFP Vektor; Clontech, Mountain View, USA), das ein AhR-GFP Fusionsprotein exprimiert in die Zellen transfiziert. Die AhR Sequenz wurde von Frau Dr. Ellen Fritsche (IUF, Düsseldorf) in den Vektor eingebracht und das Plasmid freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Transfektion des Plasmids erfolgte mit dem Nucleofector I wie unter 2.1.5 angegeben. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen wie beschrieben behandelt und die Translokation des AhR nach 1 h unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Die Zellen wurden 20 min vor der Auswertung mit 1µM Hoechst 33342 im Dunkeln bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert um die Kerne anzufärben.

2.1.9 Retrovirale Transduktion zur Expression von shRNA

Die Arbeiten für die retrovirale Transduktion wurden in den S2-Labors der Kinderklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von Herrn Prof. Hanenberg durchgeführt. Es wurden retrovirale Vektoren genutzt um shRNA (engl.: small hairpin RNA) in HL-60 Zellen einzubringen. ShRNA ist eine Vorstufe von siRNA, die von den Zellen nach einbringen der entsprechenden Sequenzen in das Genom selbst exprimiert wird. Die Haarnadelstruktur wird posttranskriptional abgespalten und es verbleibt eine doppelsträngige siRNA, die wie unter 2.1.8.1 beschrieben zum Abbau der Ziel-mRNA führt.

Retrovirale Vektoren bieten ein effektives Transfer-System für das Einschleusen fremder genetischer Information in ein Säuger genom (Singer, 2008). Als Vektoren dienten ein Plasmid, das die Information für AhR-shRNA trug (pCL1N.THPC AhR (1.4) NEO), eines,

das für eine unspezifische shRNA (Nonsense-Kontrolle, pCL1N.THPC shRNA (1.3) NEO) kodierte und ein Plasmid, das keine shRNA Information beinhaltet (Leervektor, pCL1N.THPC NEO). Die Plasmide trugen außerdem ein Resistenzgen gegen G418 (Neomycin bzw. Geneticin) zur Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen. Die Plasmide wurden freundlicherweise von Dr. Ellen Fritsche (Toxikologie, IUF Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Die hohe Infektiosität, in der der Vorteil retroviralen Transduktion liegt, bedingt gleichzeitig das Problem dieser Methode, da das Transfer-System nur ein einziges Mal infektiös sein darf. Um retrovirale Vektoren herzustellen, die nur ein einziges Mal infektiös sind, wurden die einzelnen Elemente des retroviralen Genoms voneinander getrennt. Die Gene für den viralen Proteinmantel (*gag*, group specific antigen) und die viralen Enzyme (*pol*, RNA Polymerase) sind auf einem Plasmid zu finden und das Gen für das Hüllprotein (*env*, Envelope) auf einem anderen (Abb. 7). Die Elemente, die die Transkription des retroviralen Genoms regulieren und ein sogenanntes Verpackungssignal, das dafür sorgt, dass das retrovirale Genom in einen Proteinmantel gehüllt wird, sind in dem als Transferkonstrukt bezeichneten Teil enthalten, der auch die Information für die shRNA und den Selektionsmarker enthält. Wird das rekombinante virale Teilgenom in Form der drei Vektoren in die Verpackungs-Zelle transfiziert, wird es in das Zellgenom integriert. Die dann von der rekombinanten DNA des Transferkonstrukts abgelesene RNA wird dank des Verpackungssignals mit Hilfe der von der Zelle produzierten, viralen Hüllproteine zu infektiösen Virus-Partikeln verpackt. Infizieren die Virus-Partikel die HL-60 Zellen, so wird die virale RNA durch die in die Virushülle mitverpackte Reverse-Transkriptase in eine DNA-Kopie umgeschrieben und in das Genom der infizierten Zelle integriert. Eine Weiterverbreitung ist jedoch nicht möglich, da die Gene der viralen Proteine aufgrund des fehlenden Verpackungssignals nicht eingebaut wurden.

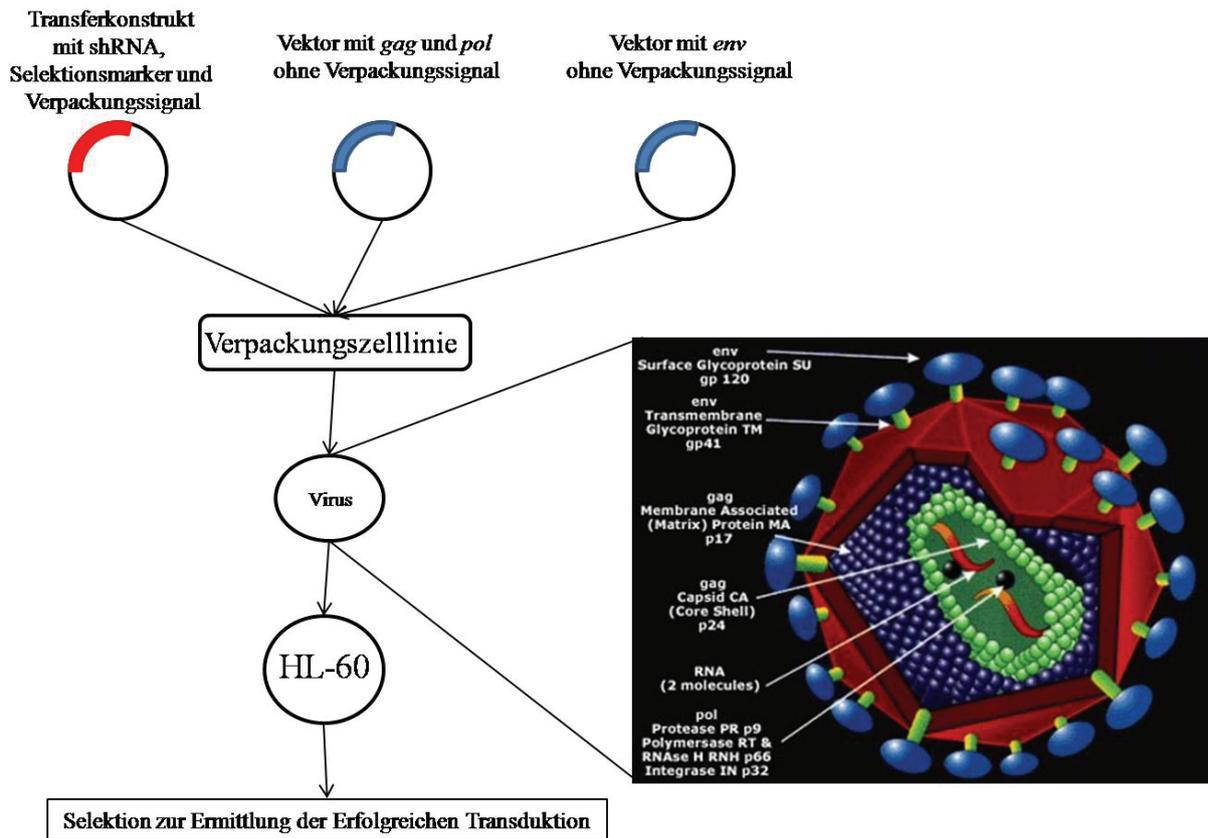


Abb. 7: Schematische Darstellung der retroviralen Transduktion. Die drei Vektoren werden in die Verpackungszelllinie transfiziert, die dann infektiösen Viren hervorbringt. Diese integrieren die Information für die Expression der shRNA und den Selektionsmarker in das Genom der HL-60 Zellen, die ihrerseits keine infektiösen Viren mehr produzieren können. Die Abbildung des Retrovirus (schwarzer Kasten) ist modifiziert nach www.staNFord.edu.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 RNA Isolierung

Die RNA wurde mit Hilfe von TRIzol™ nach Angaben des Herstellers aus den Zellen präpariert. Die Zellen wurden in 500 µl TRIzol™ aufgenommen und nach Zugabe von 100 µl Chloroform 15 sec gemischt. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 14000 x g hatten sich drei Phasen gebildet, die untere organische Phase, eine Interphase und die obere wässrige Phase. Proteine und hochmolekulare genomische DNA befinden sich vor allem in der Interphase, die RNA ist in der oberen wasserlöslichen Phase. Letztere wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Mit 250 µl Isopropanol konnte die RNA während einer Lagerung für 15 min bei RT ausgefällt werden. Die RNA wurde durch Zentrifugation pelletiert und zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde für 5 – 10 min an der Luft getrocknet, bevor es in 20 – 30 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen wurde.

2.2.2 Bestimmung der RNA Konzentration

Die Konzentration der RNA-Lösung wurde über die optische Dichte (OD) bei 260 nm Wellenlänge mit Hilfe des Nanodrops (Spectrophotometer ND-1000, Peqlab) bestimmt. Der Quotient aus OD 260 nm/OD 280 nm wurde als Maß für die Reinheit der Probe genommen, wobei der Wert für reine RNA bei 1,7 – 2 liegt.

2.2.3 Reverse Transkription

Die eingesetzte RNA-Menge wurde durch die Messung der OD bei 260 nm bestimmt. Es wurde 1 µg RNA in cDNA umgeschrieben. Um die Vervielfältigung genomischer DNA auszuschließen, wurde die RNA vor der RT-PCR mit DNase I inkubiert, um die genomische DNA abzubauen. Hierzu wurden in einem 10 µl Ansatz der RNA 1 µl 10 x Puffer mit Magnesium und 1 µl DNase I (1 U/µl) gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Mit 1 µl 25 mM EDTA wurde die DNase I in 10 min bei 65°C inaktiviert. Die DNase-behandelte RNA wurde mit 2 µl Oligo-(dT)-Primer (1 µg/µl) für 5 min. bei 60°C zur Hybridisierung inkubiert. Nach Zugabe von 7 µl DEPC-Wasser, 8 µl Reaktionspuffer, 4 µl DTT (100 mM), 4 µl dNTP (10 µM), 2 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl) und 2 µl Reverser Transkriptase (200 U/µl) wurde der

Ansatz für 60 min bei 37°C zur Elongation und für 10 min bei 70°C zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase inkubiert. Die entstandene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktion wurde in dünnwandigen 0,5 ml Reaktionsgefäßen auf Eis nach folgendem Pipettierschema angesetzt:

Tabelle 3: Pipettierschema der PCR

Bestandteil	Volumen
10-fach PCR-Puffer	2,5 µl
Vorwärts-Primer [10 µM]	0,5 µl
Rückwärts-Primer [10 µM]	0,5µl
dNTPs [100 µM]	1µl
Taq-Polymerase [4 U/µl]	0,25 µl
c-DNA	1µl
Bidest H ₂ O	19,25 µl
Gesamt	25 µl

Als Negativkontrolle wurde eine Reaktion mit Wasser anstelle des cDNA Templates mitgeführt. Die PCR wurde in einem Thermocycler (Trio, Biometra, Göttingen) mit folgendem Ablauf durchgeführt:

Tabelle 4: Programm zur Durchführung der PCR

Zyklenzahl	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Ziel
1	5	95	Denaturierung
	1	95	Denaturierung
25-35	1	Primer spezifisch	Annealing
	1,5	72	Elongation
1	10	72	Produktvervollständigung

Die Auftrennung der amplifizierten Produkte erfolgte mittels einer Horizontal-Gelelektrophorese in einem 1%igen Agarosegel mit 10 µg Ethidiumbromid. Je 2 µl Probe wurden mit 10 µl Probenpuffer vermischt. 10 µl dieses Ansatzes wurden auf das Gel

aufgetragen. Als Längenstandard wurden 0,5 µg/Spur des Molekulargewichtsmarkers, der eine 100 Bp-Leiter liefert, aufgetragen. Die DNA wurde bei 90 V für 30 min aufgetrennt, als Laufpuffer diente 1 x TAE. Die Auswertung erfolgte als Videodokumentation (UV Solo, Biometra, Göttingen) unter UV-Licht bei 302 nm.

2.2.5 Echt-Zeit-PCR (engl. Real-time-PCR)

Bei der Echt-Zeit-PCR lässt sich die Akkumulation der PCR-Produkte über eine Fluoreszenzmessung während der Reaktion verfolgen. Dafür wird ein Fluorophor eingesetzt (in diesem Fall SYBR-Green), welches spezifisch an Doppelstrang-DNA bindet. Die Fluoreszenzintensität verhält sich proportional zur doppelsträngigen DNA-Menge im Reaktionsansatz und lässt sich am Computer verfolgen. Der PCR-Ansatz bestand zur Hälfte aus SYBR-Green PCR Master Mix (Quantace, Berlin) in dem Taq-Polymearse sowie Mg₂Cl enthalten war und setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 5: Pipettierschema der RT-PCR

Komponente	Volumen
SYBR-Green	7,5 µl
Vorwärts-Primer [10 µM]	1 µl
Rückwärts-Primer [10 µM]	1 µl
c-DNA	1µl
Bidest H ₂ O	2,5 µl
Gesamt	15 µl

Als Negativkontrolle wurde eine Reaktion mit Wasser anstelle des cDNA Templates mitgeführt. Die PCR wurde in einem Rotor-Gene RG-3000 (Corbett, LTF Labortechnik, Wasserburg) mit folgendem Ablauf durchgeführt:

Tabelle 6: Programm zur Durchführung der RT-PCR

Zyklenzahl	Zeit	Temperatur [°C]	Ziel
1	10 min	95	Denaturierung
50	15 sec	95	Denaturierung
	25 sec	Primer spezifisch	Annealing
	30 sec	72	Elongation
	2 sec	72	Fluoreszenzmessung
1	15 min	60-95	Schmelzkurve

2.2.6 Semiquantitative PCR

Um die Menge eines PCR-Produkts bestimmen zu können, wurden die Ansätze gegen das Haushaltsgen HPRT abgeglichen. Dafür wurden in der PCR die gleichen Proben mit den zu testenden Primern und den HPRT-Primern amplifiziert. Der Anstieg der Produktmengen verläuft durch die Verdopplung des Produktes in jedem Zyklus der PCR exponentiell. Legt man durch den linearen Bereich dieser logarithmischen Kurve eine Gerade parallel zur Zeitachse, dann nennt man die Schnittpunkte jeder einzelnen Produktkurve mit dieser Gerade Crossing Point (CP). Nach dem Lauf wurde der sogenannte delta-CP aus der Differenz der Crossing Points des zu testenden Transkripts und HPRT gebildet. Die Differenz der delta-CP der unbehandelten und der behandelten Probe wurden zum delta-delta-CP verrechnet. Zur Berechnung der Induktion wurde der delta-delta-CP als Potenz zur Basis 2 verwendet (Pfaffl, 2001).

2.2.7 Biotinylierung der RNA

Die mRNA wurde wie unter 2.2.1 beschrieben aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben (2.2.3). Durch eine *in vitro* Transkription mit biotinylierten Nukleotiden (Enzo Bio Array HighYield RNA transcript labelling kit; Affymetrix, High Wycombe, USA) wurde anschließend eine biotinylierte cRNA synthetisiert. Die Aufreinigung und Fragmentierung der Proben erfolgte mit Hilfe des „Affymetrix GeneChip Sample Cleanup Moduls“ nach Herstellerangaben. Die Reinheit und Integrität der Proben wurde zu mehreren Zeitpunkten während des Experiments mittels Gelelektrophorese überprüft.

2.2.8 Microarrayanalyse

Nach der Generierung der aufgereinigten und biotinylierten RNA wurden die folgenden Schritte, wie die Hybridisierung der Proben auf die Chips, die Färbung mit Phycoerythrin und das Scannen der Chips von der Affymetrix Core Lab Facility an der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt. Die RNA wurde auf einen „Human 430A Gene Chip“ von Affymetrix hybridisiert, der 22690 gespottete Transkripte („probe sets“) enthält, die durch eine Proben-ID eindeutig gekennzeichnet sind. Jedes Transkript beinhaltet 22 unterschiedliche Oligonukleotid-Fragmente aus 25 Nukleotiden („probe cells“). 11 dieser Fragmente haben eine perfekte Hybridisierungssequenz („perfect match“), während 11 Fragmente durch einen Nukleotid-Austausch an Position 13 von der genauen Sequenz abweichen („mismatch“). Die Perfect Match und Mismatch-Informationen des Chips wurden genutzt, um nach Vergleich mit einem Schwellenwert zu entscheiden, ob das einzelne Transkript in dieser Probe exprimiert wird, und somit als „present“, „marginal“ oder „absent“ gewertet wird. Für die Evaluation der Daten enthält der Genchip außerdem Hybridisierungskontrollen, Poly-A-Kontrollen, Normalisierungskontrollen und Haushaltsgen-Kontrollen. Die Normalisierung und Umwandlung der beim Scannen der Chips erhaltenen Intensitätsdaten in Signalstärken ($\log(2)$ Expression) wurde mit dem „Bioconductor affy package“ und dem RMA (robust microarray analysis) Algorithmus durchgeführt.

2.2.9 Protein-Isolierung

1×10^7 Zellen wurden in 200 μ l T-PER Lösung (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) aufgenommen und 30 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10000 x g reicherten sich die Proteine im Überstand an. Die Überstände wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.10 SDS-PAGE

In der SDS-PAGE (engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Das SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine und lädt sie gleichmäßig negativ, so dass sie im polymerisierten Acrylamid nur nach Größe aufgetrennt werden. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) und APS (Ammoniumpersulfat) werden beim Gießen des Gels hinzugegeben um die Kettenreaktion des Polymerisierens des Acrylamids auszulösen bzw. zu katalysieren. Es werden zwei

verschiedene Puffer eingesetzt, die einen spezifischen pH Wert für zwei unterschiedliche Regionen im Gel einstellen. Das Gel in das die Proben einlaufen, das sogenannte Sammelgel wird auf einen pH von 6,8 eingestellt bei dem die Proteine langsamer als die Lauffront im Gel wandern und somit auf der gleichen Höhe im Gel angesammelt werden. Im Trenngel bei pH 8,8 werden die Proteine dann ihrer Größe nach aufgetrennt. Trenn- und Sammelgel wurden aus den in 1.3 angegebenen Komponenten und Verhältnissen gegossen.

Die Proben wurden mit denaturierendem 3-fachem Probenpuffer versetzt. Das im Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol reduziert die Proteine und löst die Disulfidbrücken wodurch die Proteine linearisiert vorliegen. Als Größenstandard dienten 5 μ l BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen). Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 1h bei 150 V.

2.2.11 Western Blot

Beim Western Blot wird ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Somit wandern die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran. An der Membranoberfläche bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Das Gel aus der SDS-PAGE wurde 15 min zusammen mit der deckungsgleichen Nitrozellulosemembran in Blot-Puffer inkubiert. Es werden nacheinander ein mit Blotpuffer getränktes Blotting-Papier (3mm stark, Whatman, Dassel), die Nitrozellulosemembran, das Gel und ein weiteres mit Blotpuffer getränktes Blotting-Papier auf die Anode der Trans-Blot® SD Semi-Dry Westernblotapparatur (BioRad, München) aufgelegt. Nach Auflegen der Kathode werden 20 mA für 1 h angelegt um Proteine bis 120 kD auf die Membran zu transferieren.

2.2.12 Immunochemische Detektion von Proteinen

Die Nitrozellulosemembran wurde zunächst in Ponceau S Lösung 5 min auf dem Schüttler inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit destilliertem Wasser lässt sich die Effizienz des Westernblottransfers anhand der durch Ponceau S rot gefärbten Proteine abschätzen. Bei erfolgreichem Transfer wurde die Membran 3 mal für 10 min in TBST gewaschen und anschließend mit 2 % Milchpulver in TBST für 1 h inkubiert um die restlichen Membranbindungsstellen abzusättigen und unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Über Nacht wurde die Membran dann bei 4°C mit dem Erstantikörper inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper in TBST mit 2% Milchpulver für 1 h bei RT. Nach weiteren drei Waschschritten wurde die Membran mit dem Detektionsreagenz SuperSignal West Dura (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) inkubiert und die Signale mit einer Detektionskammer (AlphaInnotec, San Leandro, USA) erfasst.

III. Ergebnisse

1. Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin haben eine wachstumshemmende Wirkung auf HL-60 Zellen

Der antikanzerogene bzw. antileukämische Effekt von Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin äußert sich laut Literatur in der Wachstumshemmung von Tumor- bzw. Leukämiezellen. Abb. 8 zeigt, dass alle drei gewählten Substanzen einen signifikanten Effekt auf die Viabilität von HL-60 Zellen besitzen. Für Curcumin liegt die wachstumshemmende Konzentration bei $\geq 25 \mu\text{M}$, für Indirubin-3'-oxim bei $\geq 5 \mu\text{M}$ und für Quercetin bei $\geq 100 \mu\text{M}$. Die Konzentrationen, bei denen nur noch die Hälfte der Zellen lebendig waren (LD_{50}) betragen für Curcumin $30 \mu\text{M}$, für Indirubin-3'-oxim $9 \mu\text{M}$ und für Quercetin $95 \mu\text{M}$. Für weitere Versuche wurden die maximalen Konzentrationen $> LD_{50}$ gewählt, die eine gute Löslichkeit unter den gewählten Bedingungen besaßen: Für Curcumin $50 \mu\text{M}$, für Indirubin-3'-oxim $10 \mu\text{M}$ und für Quercetin $100 \mu\text{M}$. Limitiert war die Löslichkeit durch die maximale DMSO Konzentration von $0,6 \%$. Dies war die maximale Konzentration, bei der DMSO keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen, oder die Expression des Zielgens des AhR Cyp1a1 besitzt. Die Substanzen wurden in $0,5 \%$ DMSO gelöst.

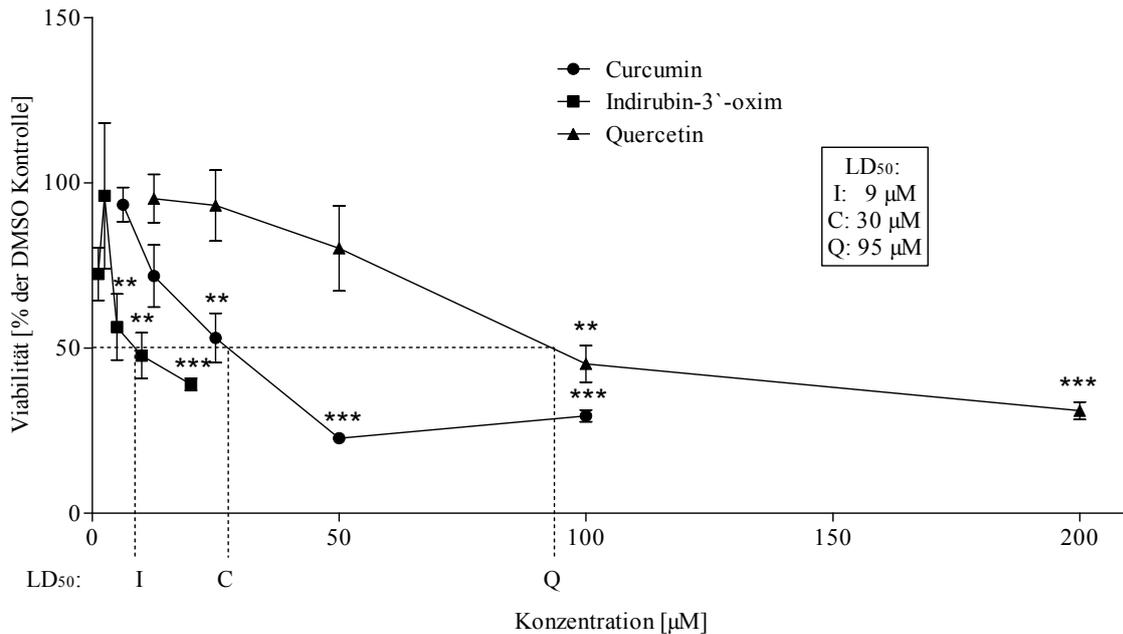


Abb. 8: Curcumin (C), Indirubin-3'-oxim (I) und Quercetin (Q) haben einen konzentrationsabhängigen wachstumshemmenden Effekt auf HL-60 Zellen. HL-60 Zellen ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden in 100 µl Medium in einer 96-well Platte für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen behandelt und mittels MTT Assay ihre Viabilität bestimmt. Dargestellt ist die Viabilität in Prozent zur Kontrollbehandlung (DMSO) aus drei unabhängigen Versuchsreihen und deren Standardabweichungen. Für jede Substanz wurde die Konzentration bestimmt, bei der nur noch 50 % der Zellen lebendig waren (LD_{50}). Signifikanzen wurden berechnet mit dem student's t-test: $P < 0,05 = *$; $P < 0,01 = **$; $P < 0,001 = ***$.

1.1 Die Mechanismen der Wachstumshemmung in HL-60 Zellen

Um die Hintergründe des wachstumshemmenden Effekts von Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin auf HL-60 Zellen aufklären zu können, war es wichtig den zu Grunde liegenden Mechanismus zu bestimmen. In der Literatur sind Curcumin und Quercetin in HL-60 Zellen als Apoptose-induzierend beschrieben, Indirubin-3'-oxim wirkt als Beschleuniger der Zelldifferenzierung von HL-60 Zellen.

1.1.1. Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin induzieren die Caspase Aktivität in HL-60 Zellen

Die Aktivierung der Caspasen 3/7, 8 und 9 durch Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin in HL-60 Zellen wurde luminometrisch bestimmt. Abbildung 9 zeigt, dass alle drei Substanzen sowohl die Caspasen des Mitochondrien abhängigen als auch des Rezeptor abhängigen Apoptoseweges induzieren. Auch die nachgeschalteten Effektorcaspasen 3 und 7

wurden aktiviert. Curcumin und Quercetin zeigten bei den gewählten Konzentrationen eine weitestgehend übereinstimmende Induktion der untersuchten Caspasen. Sie induzierten die Effektorcaspasen 3 und 7 um ca. das 7-fache der basalen Aktivität, die Mitochondrien abhängige Caspase 9 ähnlich stark um ca. das 6-fache und die Rezeptor abhängige Caspase 8 etwas geringer um ca. das 5-fache. Indirubin-3'-oxim dagegen zeigte eine Aktivierung aller Caspasen auf ungefähr das 2-fache der basalen Aktivität. Caspase 9 wurde zwar durch alle drei Substanzen stärker als Caspase 8 aktiviert, jedoch ist diese Beobachtung nicht signifikant.

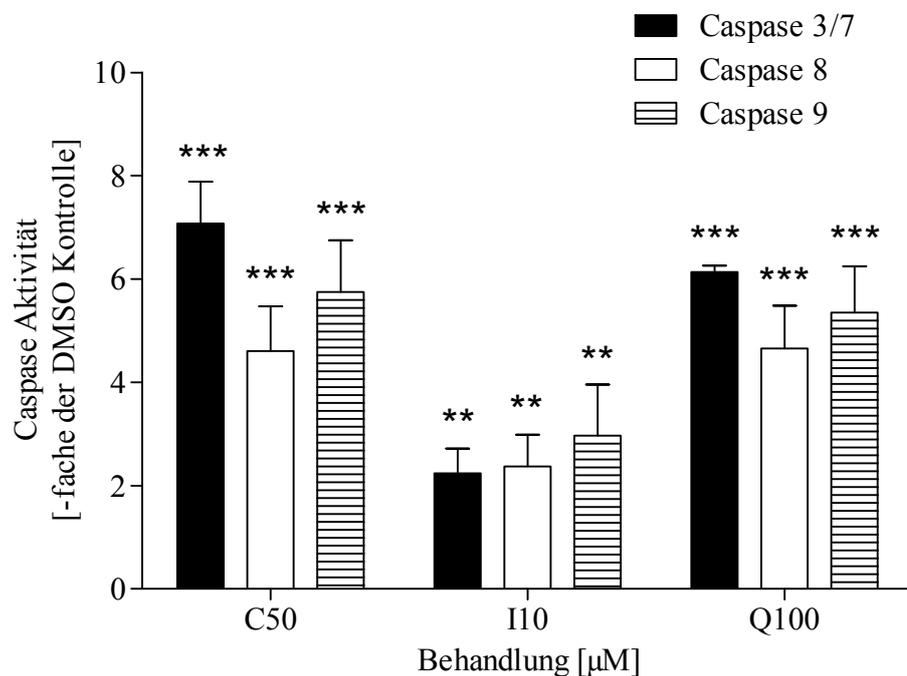


Abb. 9: Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin induzieren die Caspase Aktivitäten nach 24 h Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen. HL-60 Zellen ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden in $100 \mu\text{l}$ Medium in einer 96-well Platte für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen behandelt und mittels CaspaseGlo™ Assays die Caspaseaktivitäten bestimmt. Dargestellt sind die Caspase Aktivitäten in Prozent zur Kontrollbehandlung (DMSO) aus drei unabhängigen Versuchsreihen und deren Standardabweichungen. Signifikanzen wurden berechnet mit dem student's t-test: $P < 0,05 = *$; $P < 0,01 = **$; $P < 0,001 = ***$.

1.1.2 Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin regulieren Gene der bcl-2 Familie

Das Verhältnis der proapoptotischen zu den antiapoptotischen Proteinen der bcl-2 Familie ist ein Maß für die Induktion der Apoptose. Die PCR-Ergebnisse der Expression der Gene der bcl-2 Familie ergaben, dass alle drei Substanzen das Verhältnis von bax zu bcl-2 erhöhten

(Abb. 10). Indirubin-3'-oxim und Quercetin zeigten eine Aufregulierung um das 5-6-fache und Curcumin um das 3-4-fache. Curcumin induzierte zusätzlich das Verhältnis von bad zu bcl-xl um ca. das doppelte, wogegen Indirubin-3'-oxim und Quercetin hier keine signifikanten Effekte zeigten.

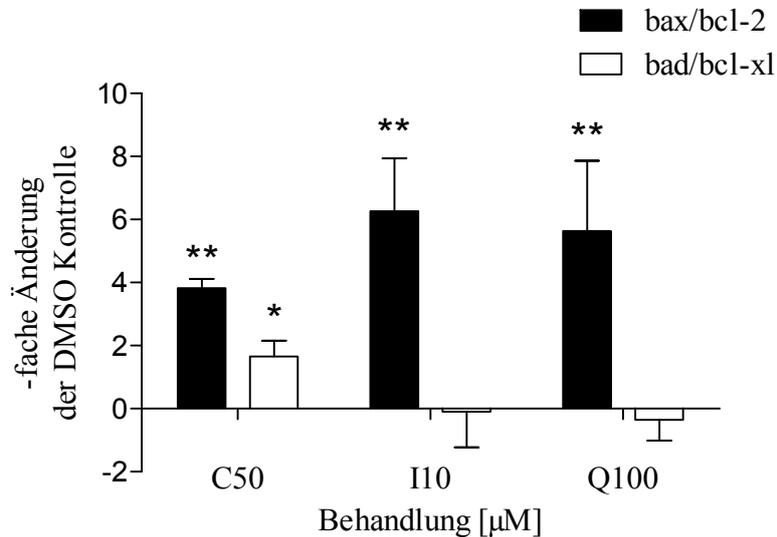


Abb. 10: Curcumin (C50), Indirubin-3'-oxim (I10) und Quercetin (Q100) verändern auf Expressionsebene das bax/bcl-2 Verhältnis zu Gunsten des proapoptotischen bax und Curcumin das bad/bcl-xl Verhältnis zu Gunsten des proapoptotischen bad. HL-60 Zellen (5×10^6 /ml) wurden in 1 ml Medium in einer 24-well Platte für 24 h mit 50 μM Curcumin (C50), 10 μM Indirubin-3'-oxim (I10) und 100 μM Quercetin (Q100) behandelt, die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben und RT-PCR durchgeführt. Dargestellt ist die Änderung der Verhältnisse von bax/bcl-2 und bad/bcl-xl im Vergleich zur Kontrollbehandlung (DMSO) aus drei unabhängigen Versuchsreihen und deren Standardabweichungen. Signifikanzen wurden berechnet mit dem student's t-test: $P < 0,05 = *$; $P < 0,01 = **$; $P < 0,001 = ***$.

1.1.3 Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin bewirken einen Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$)

Ändert sich das Verhältnis der Gene der bcl-2 Familie zu Gunsten der proapoptotischen Proteine führt dies zu einem Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$. Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes TMRM (Tetramethylrhodamin-methylester) kann dieses Potential bestimmt werden. Aufgrund seiner positiven Ladung akkumuliert sich TMRM in den negativ geladenen Mitochondrien und kann dann photometrisch im Durchflusszytometer detektiert werden. Bei einer Depolarisation der Mitochondrien, wie zu Beginn der Apoptose, werden dort gespeicherte Anionen freigesetzt, woraufhin die TMRM Konzentration dort ebenfalls sinkt.

Hieraus resultiert eine Abschwächung des Signals. Die Menge des akkumulierten TMRM ist somit proportional zum $\Delta\Psi_m$.

Abb. 11 zeigt das $\Delta\Psi_m$ von HL-60 Zellen nach 24 h Behandlung mit Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin mit den angegebenen Konzentrationen. Curcumin und Indirubin-3'-oxim bewirken eine Reduzierung des $\Delta\Psi_m$ um 74 bzw. 68 %. Dies bedeutet eine Permeabilitätserhöhung der Mitochondrienmembran, da das Potential nicht aufrechterhalten werden kann. Die Permeabilitätserhöhung ist auf eine verstärkte Expression proapoptischer und porenbildender Proteine der bcl-2 Familie zurückzuführen und führt letztendlich zu einem Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ (Harris, 2000). Die Behandlung mit Quercetin beeinflusst das $\Delta\Psi_m$ nicht, obwohl Quercetin das Verhältnis von bax zu bcl-2 ähnlich aufreguliert wie Indirubin-3'-oxim.

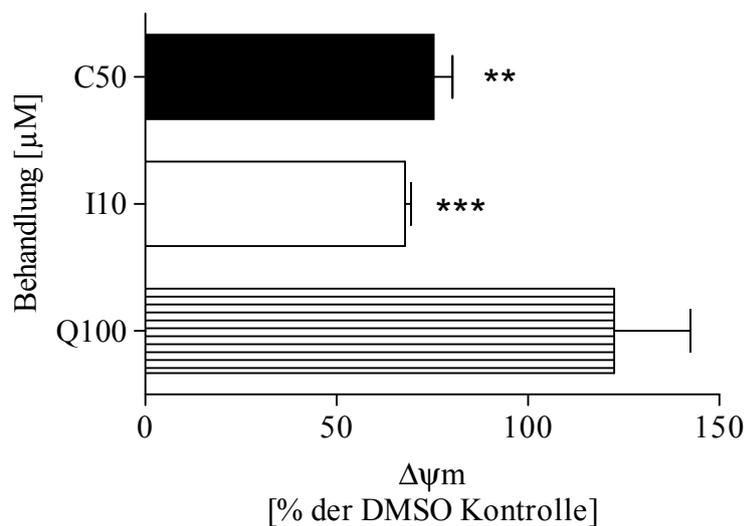


Abb. 11: Das mitochondriale Transmembranpotential ($\Delta\Psi_m$) in HL-60 Zellen sinkt nach 24 h Behandlung mit Curcumin (C50) und Indirubin-3'-oxim (I10). HL-60 Zellen (5×10^6 / ml) wurden in 2ml Medium in einer 12-well Platte für 24 h mit 50 μM Curcumin (C50), 10 μM Indirubin-3'-oxim (I10) und 100 μM Quercetin (Q100) behandelt und nach Zugabe von 10 μM TMRM die Fluoreszenz am Durchflusszytometer vermessen. Dargestellt ist das $\Delta\Psi_m$ in Prozent der Kontrollbehandlung (DMSO) aus drei unabhängigen Versuchsreihen und deren Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit dem student's t-test berechnet: $P < 0,05 = *$; $P < 0,01 = **$; $P < 0,001 = ***$.

1.1.4 Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin reduzieren den ROS-Gehalt in HL-60

Zellen

Curcumin und Quercetin sind in der Literatur als antioxidative Substanzen beschrieben, wobei beide auch eine Induktion von ROS bewirken können. Die eigentlich antioxidativen Eigenschaften dieser zwei Substanzen können durch verschiedene Faktoren wie die Aktivierung bestimmter Stoffwechselfvorgänge, oder Generierung bestimmter Metabolite auch ins Gegenteil gekehrt werden (Clerkin, 2008). Diese Umkehrung kann sowohl zellspezifisch sein, als auch von der Dauer und Art der Behandlung abhängen. Für Indirubin-3'-oxim ist bisher kein Einfluss auf den ROS Gehalt von Zellen bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte bisher die proapoptotische Wirkung der drei Substanzen gezeigt werden. Durch die Ermittlung des ROS Gehaltes in den Zellen sollte geklärt werden, ob die Induktion der Apoptose durch Generierung von ROS geschieht.

Abb. 12 zeigt den ROS Gehalt in HL-60 Zellen nach Behandlung mit den gewählten Konzentrationen an Curcumin, Indirubin-3'-oxim oder Quercetin im Vergleich zur DMSO Kontrolle nach 24 Stunden. Alle drei Substanzen wirkten antioxidativ, d.h. sie reduzierten den ROS-Gehalt in HL-60 Zellen nach 24 h Behandlung. Der MFI (Mean fluorescent index) betrug bei den Kontrollzellen (DMSO behandelt) ca. 70, bei den mit Curcumin, Indirubin-3'-oxim oder Quercetin behandelten Zellen jeweils ungefähr 35. Der ROS-Gehalt in HL-60 Zellen wurde also durch die Behandlungen nach 24 h ungefähr halbiert.

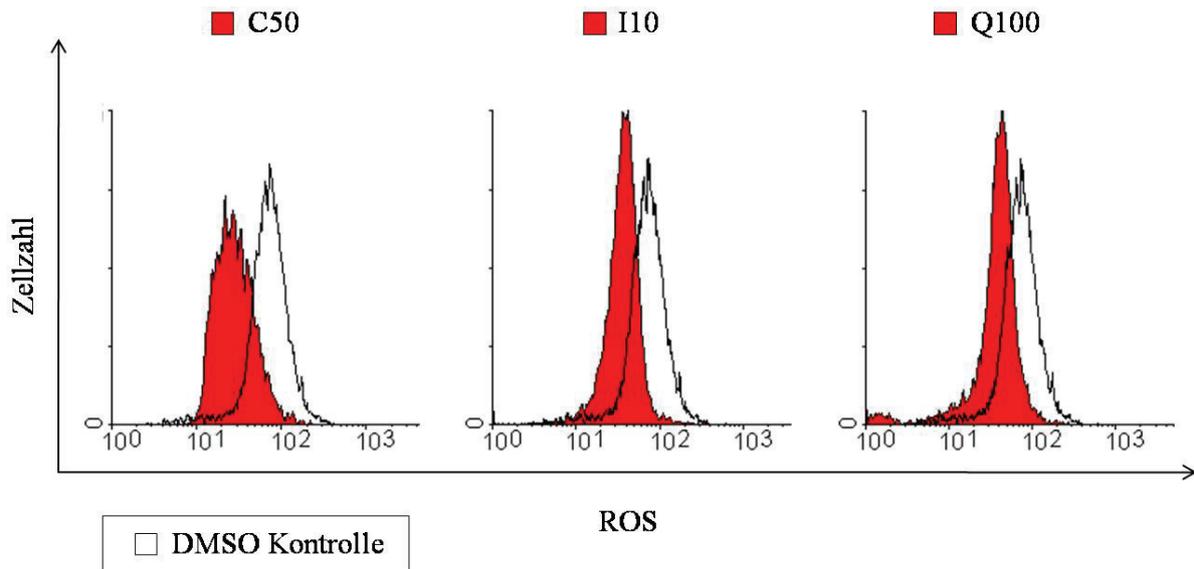


Abb. 12: Curcumin (C50), Indirubin-3'-oxim (I10) und Quercetin (Q100) verringern den ROS Gehalt in HL-60 Zellen nach 24 h. HL-60 Zellen (5×10^6 / ml) wurden in 2 ml Medium in einer 12-well Platte für 24 h mit mit 50 μ M Curcumin (C50), 10 μ M Indirubin-3'-oxim (I10) und 100 μ M Quercetin (Q100) behandelt und nach Zugabe von 10 μ M DCFA-DA die Fluoreszenz am Durchflusszytometer vermessen. Dargestellt ist der ROS-Gehalt der behandelten Zellen (roter Peak) im Vergleich zur DMSO Kontrolle (weißer Peak). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

1.1.5 Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin blockieren den Zellzyklus in HL-60 Zellen

Die Behandlung von HL-60 Zellen mit Curcumin, Indirubin-3'-oxim oder Quercetin führte zu signifikanten Veränderungen im Zellzyklus. Die auch als Zielgene des AhR beschriebenen Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 (s. Abb.1) wurden durch alle drei Substanzen induziert. p21 wurde mit ca. dem 16-fachen in gleichem Maße von allen drei Substanzen und p27 durch Curcumin mit ungefähr dem 8-fachen stärker als durch Indirubin-3'-oxim oder Quercetin (3-fach) induziert wird (Abb. 13).

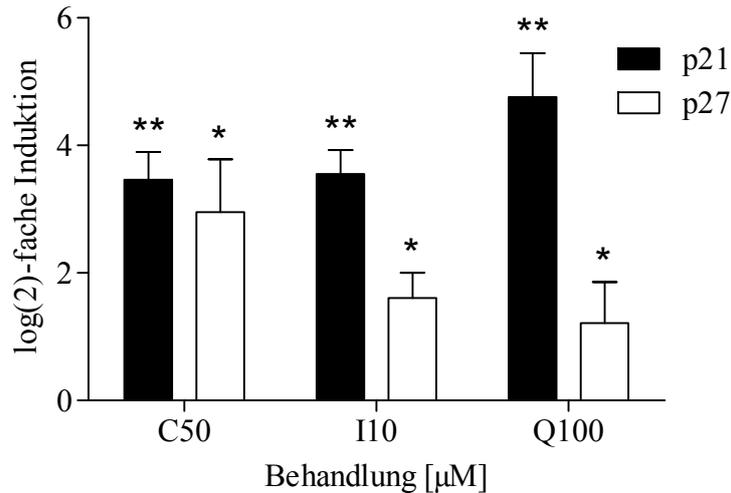


Abb. 13: Curcumin (C50), Indirubin-3'-oxim (I10) und Quercetin (Q100) induzieren die mRNA der Zellzyklusinhibitoren p21 und p27. HL-60 Zellen ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden in 1 ml Medium in einer 24-well Platte für 24 h mit 50 μM Curcumin (C50), 10 μM Indirubin-3'-oxim (I10) und 100 μM Quercetin (Q100) behandelt, die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben und RT-PCR durchgeführt. Dargestellt ist die log(2)-fache Induktion der basalen Expression der Kontrollbehandlung (DMSO) aus drei unabhängigen Versuchsreihen und deren Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit dem student's t-test berechnet: $P < 0,05 = *$; $P < 0,01 = **$; $P < 0,001 = ***$.

Aus der Aktivierung von Zellzyklusinhibitoren wie p21 und p27 folgt eine Blockade des Zellzyklus, wobei die untersuchten Inhibitoren nicht spezifisch eine bestimmte Phase blockieren (Abb. 1). Dies zeigt sich auch bei der Betrachtung der Verteilung der Zellen auf die einzelnen Phasen des Zellzyklus durch Färbung der DNA mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) vor und nach Behandlung mit Curcumin, Indirubin-3'-oxim oder Quercetin (Abb. 14). Zunächst wird deutlich, dass alle drei Substanzen zur Anreicherung von Zellen in der sub G_1 -Phase führen also Apoptose induzieren. Die Menge an Zellen die sich in der sub G_1 -Phase befinden variiert jedoch zwischen den Substanzen. Während sich nach Curcumin Behandlung ca. 50 % der Zellen in der sub G_1 -Phase befinden sind es nach Indirubin-3'-oxim nur ca. 30 % und nach Quercetin Behandlung 40 %. Diese Zahlen korrelieren mit den Intensitäten der zuvor bestimmten Caspaseaktivitäten (1.1.1). Die anderen Phasen des Zellzyklus zeigen auch abweichende Verteilungen nach den unterschiedlichen Behandlungen. Curcumin arretiert die Zellen in der S-Phase, da im Vergleich zur Kontrolle nur noch wenige Zellen in der G_2/M -Phase zu detektieren sind. Indirubin-3'-oxim blockiert den Zellzyklus in der G_1 -Phase, da verhältnismäßig weniger Zellen in der S- und G_2/M -Phase zu detektieren sind als im Kontrollansatz. Indirubin-3'-oxim zeigt ebenfalls eine geringe Blockade in der G_2/M -Phase. Dies ergibt sich daraus, dass im Kontrollansatz mehr Zellen in der S-Phase zu finden sind, als in der G_2/M -Phase, sich diese

Verhältnis nach Indirubin-3'-oxim Behandlung jedoch umkehrt (Abb. 14 B). Die Zellen reichern sich also nach Verlassen der S-Phase in der G₂/M-Phase an. Quercetin arretiert die Zellen stark in der G₁-Phase, da sowohl in der S- als auch der G₂/M-Phase kaum noch Zellen zu detektieren sind (Abb. 14).

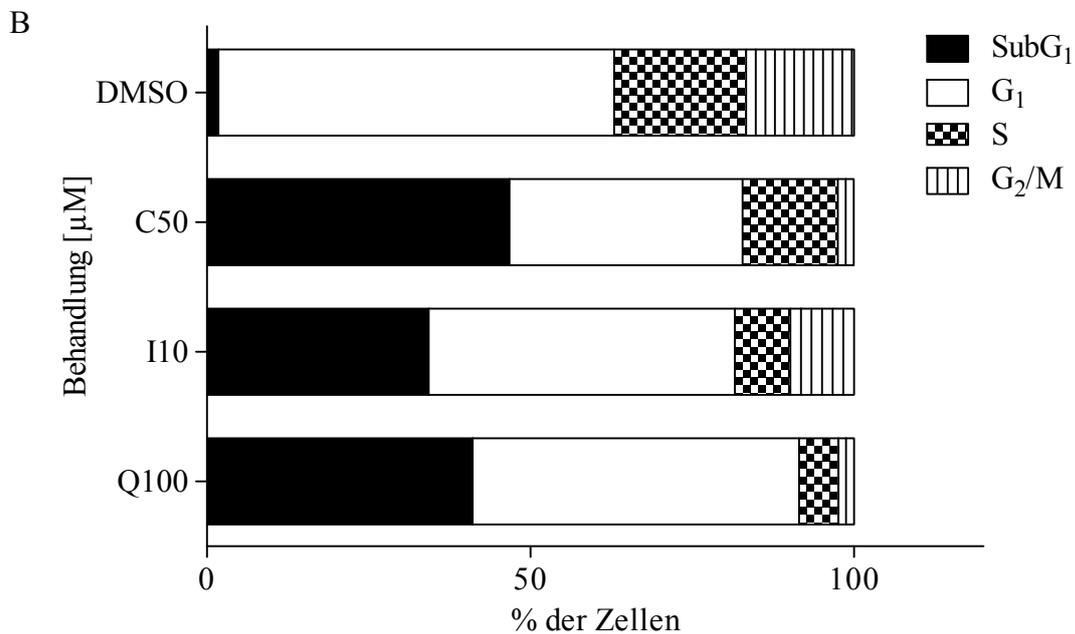
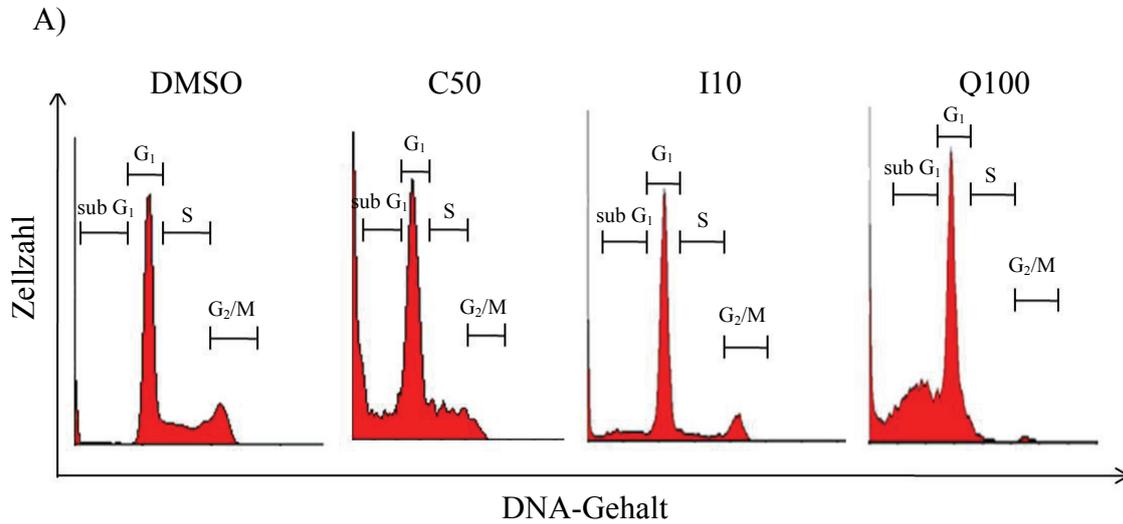


Abb. 14: Curcumin (C50), Indirubin-3'-oxim (I10) und Quercetin (Q100) verändern die Verteilung von HL-60 Zellen in den Phasen des Zellzyklus. HL-60 Zellen (5×10^6 / ml) wurden in 2 ml Medium in einer 12-well Platte für 24 h mit 50 μ M Curcumin (C50), 10 μ M Indirubin-3'-oxim (I10) und 100 μ M Quercetin (Q100) behandelt und nach Zugabe von 10 μ M PI die Fluoreszenz am Durchflusszytometer vermessen. Dargestellt sind die Verteilung der Zellen in den Phasen des Zellzyklus repräsentativ für drei unabhängige Versuche als Übersicht (A) und prozentual (B).

1.1.6 Tabellarische Zusammenschau der Ergebnisse

Um zu diesem Zeitpunkt der Experimente einen Überblick über die bisherigen Ergebnisse der untersuchten Wirkungen von Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin auf HL-60 Zellen nach 24 h zu bekommen, sind die Daten in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Einfluss von 50 μ M Curcumin, 10 μ M Indirubin-3'-oxim und 100 μ M Quercetin auf die Apoptose Induktion, den ROS-Gehalt und die Zellzyklusregulierung von HL-60 Zellen nach 24 h.

	Curcumin 50 μM	Indirubin-3'-oxim 10 μM	Quercetin 100 μM
Viabilität	25 %	50 %	50%
Apoptose Induktion			
Caspase 3/7 Induktion	7-fach	2-fach	6-fach
Caspase 8 Induktion	5-fach	2-fach	5-fach
Caspase 9 Induktion	6-fach	3-fach	5-fach
bax/bcl-2 Induktion	4-fach	6-fach	5-fach
bad/bcl-xl Induktion	2-fach	keine	keine
$\Delta\psi_m$	74 %	68 %	100 %
ROS	50 %	50 %	50 %
Zellzyklusinhibierung			
p21 Induktion	4-fach	4-fach	5-fach
p27 Induktion	3-fach	2-fach	2-fach
Zellen in Zellzyklusphase			
sub G₁	47 %	34 %	41 %
G₁	36 %	47 %	50 %
S	15 %	9 %	6 %
G₂/M	2 %	10 %	3 %

2. Der AhR in HL-60 Zellen

2.1 HL-60 Zellen exprimieren den AhR

Um festzustellen ob der AhR und seine Dimerisierungspartner Arnt und AhRR in HL-60 ausgeprägt werden, wurde die RNA von HL-60 Zellen isoliert, in DNA umgeschrieben und die Transkripte mittels PCR bestimmt. Sowohl der AhR als auch sein Dimerisierungspartner Arnt und der AhRR konnten in HL-60 Zellen mittels PCR detektiert werden (Abb. 15 A). Die Expression des AhR Proteins (~ 94 kD) in HL-60 Zellen konnte mittels Western-Blot ebenfalls gezeigt werden (Abb. 15 B).

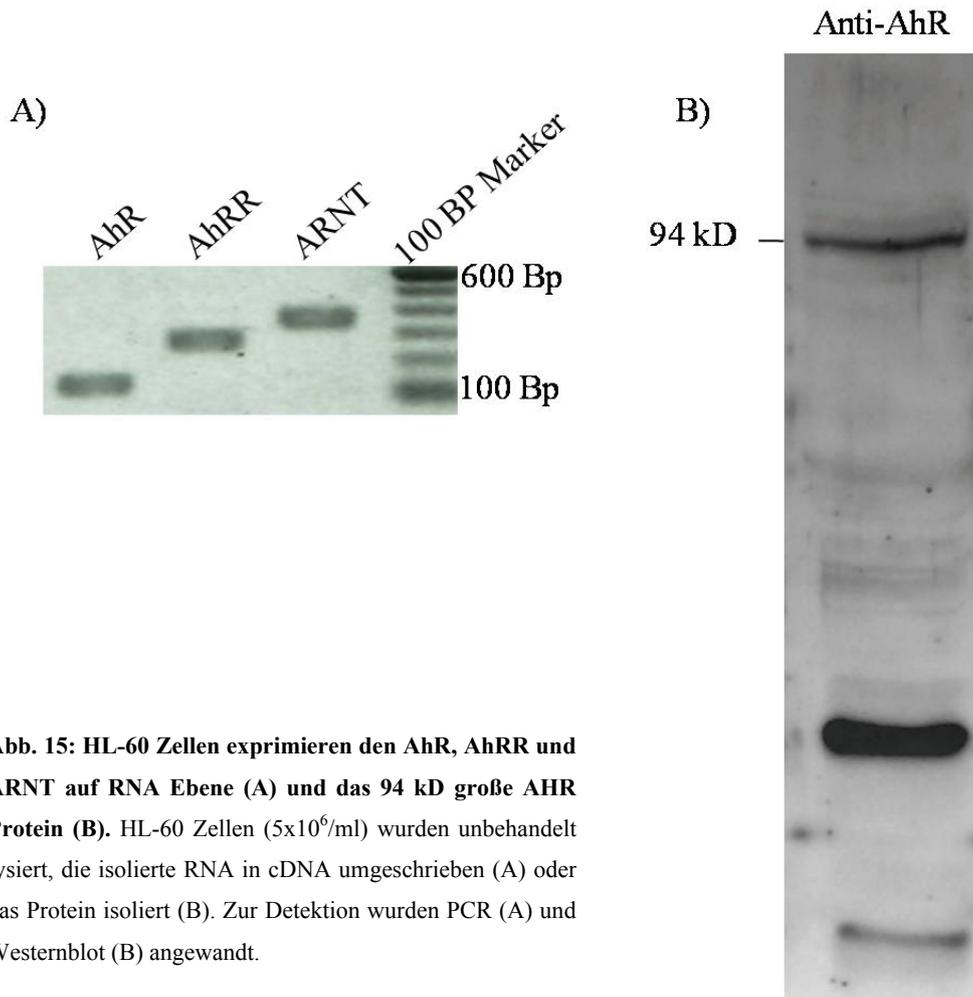


Abb. 15: HL-60 Zellen exprimieren den AhR, AhRR und ARNT auf RNA Ebene (A) und das 94 kD große AHR Protein (B). HL-60 Zellen (5×10^6 /ml) wurden unbehandelt lysiert, die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben (A) oder das Protein isoliert (B). Zur Detektion wurden PCR (A) und Westernblot (B) angewandt.

2.2 Der AhR ist aktivierbar in HL-60 Zellen

Die Bindung eines Liganden an den AhR führt zu seiner Aktivierung und der Translokation aus dem Zytoplasma in den Zellkern. Die Transfektion von HL-60 Zellen mit einem Plasmid, das ein funktionelles AhR-GFP Fusionsprotein exprimiert machte es möglich, den AhR in der Zelle zu lokalisieren. In Abbildung 16 ist die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von transfizierten Zellen dargestellt. Die Kontrollbehandlung mit DMSO für 45 min führte nicht zu einer Translokation des AhR, was daran zu erkennen war, dass die Fluoreszenz (A) des AhR-GFP Fusionsproteins in der gesamten Zelle, also in Zytoplasma und Zellkern gleichmäßig verteilt war. Die Behandlung mit dem hochaffinen AhR Liganden TCDD (10 nM) führte zu einer Konzentrierung der Fluoreszenz im Zellkern (A), der durch die DAPI-Färbung (B) in seiner Größe gekennzeichnet ist und mit den Ausmaßen der Fluoreszenz deckungsgleich ist. Dies bedeutet, dass die Behandlung von HL-60 Zellen mit 10 nM TCDD den AhR aktiviert und zu seiner Translokation in den Kern führt.

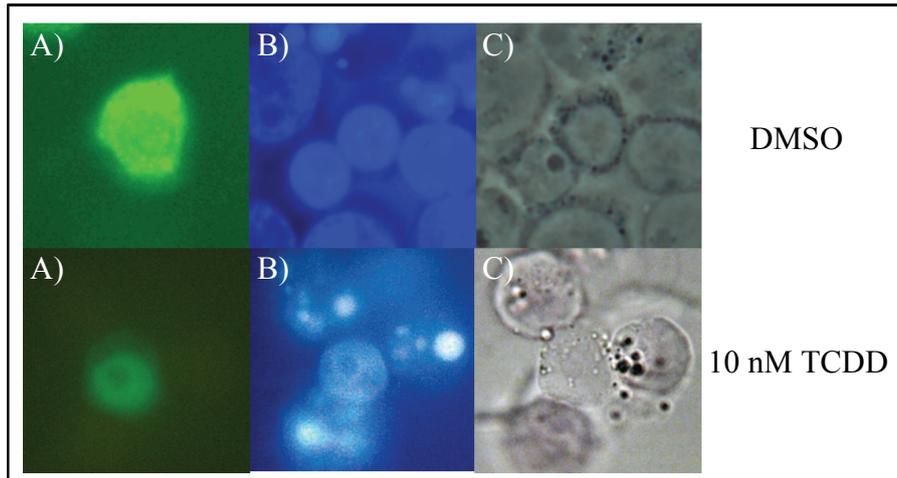


Abb. 16: 45 Minuten TCDD Behandlung in HL-60 Zellen führt zur Translokation des AhR in den Zellkern. HL-60 Zellen wurden mit einem Plasmid transfiziert, das ein AhR-GFP-Fusionsprotein exprimiert und mit 10 nM TCDD oder DMSO als Kontrolle für 45 min behandelt. Die Fluoreszenz des AhR-GFP-Fusionsproteins (A), die Hoechst 33342-Färbung des Zellkerns (B) und der Umriss der Zelle (C) wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

2.3 Das AhR Zielgen CYP1a1 ist induzierbar in HL-60 Zellen

Erst die Aktivierung des AhR durch Ligandenbindung führt zur Expression der Zielgene. Um die Aktivierung des AhR in HL-60 Zellen nachzuweisen, wurde die Expression des klassischen AhR-Zielgens Cyp1a1 nach Behandlung mit dem hoch affinen AhR Liganden TCDD mittels PCR gemessen (Abb. 17). Die Cyp1a1 Expression nach Behandlung mit 10 nM TCDD für 24 h zeigt ein deutlich stärkeres Signal im Vergleich zu der Kontrollbehandlung (DMSO).

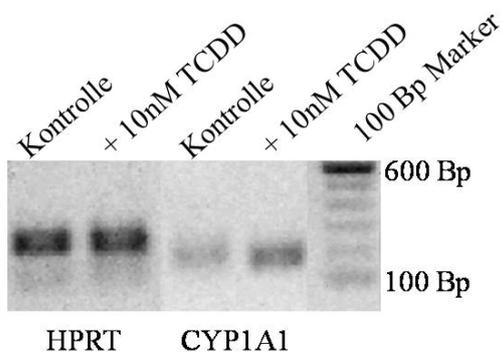


Abb. 17: Das AhR Zielgen CYP1a1 ist durch TCDD in HL-60 Zellen induzierbar. HL-60 Zellen ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden 24 h nach Behandlung mit 10 nM TCDD lysiert und die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Zur Detektion der Induktion wurden PCRs durchgeführt und die eingesetzte DNA Menge anhand des Haushaltsgens HPRT bestimmt.

2.4 Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin aktivieren den AhR in HL-60 Zellen

In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, dass die antileukämischen Effekte von Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin durch den AhR vermittelt werden. Um dies weiter untersuchen zu können, war es wichtig die Aktivierung des AhR durch diese drei Substanzen in HL-60 Zellen nachzuweisen. Hierzu wurde erneut das AhR-GFP Fusionsprotein in HL-60 Zellen transfiziert und die Lokalisation des AhR nach Behandlung fluoreszenzmikroskopisch bestimmt.

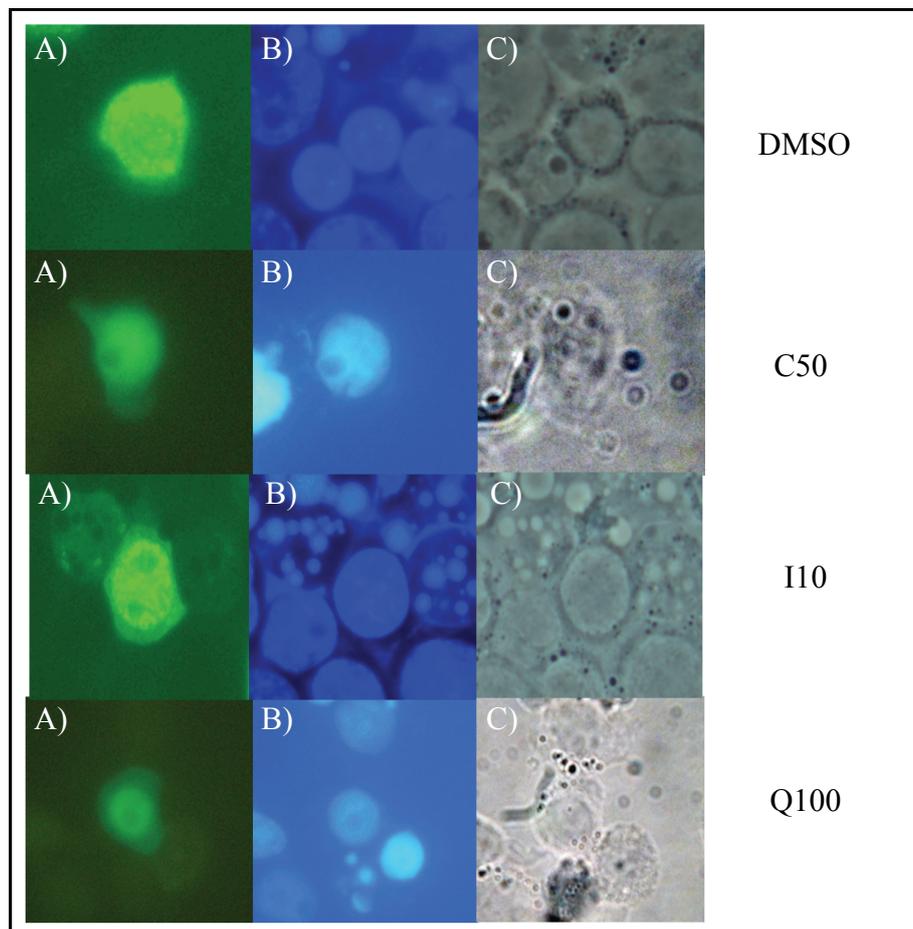


Abb. 18: Curcumin (C50), Indirubin-3'-oxim (I10) und Quercetin (Q100) aktivieren den AhR in HL-60 Zellen. HL-60 Zellen wurden mit einem Plasmid transfiziert, das ein AhR-GFP-Fusionsprotein exprimiert und mit 50 μ M Curcumin (C50), 10 μ M Indirubin-3'-oxim (I10) und 100 μ M Quercetin (Q100) oder DMSO als Kontrolle für 45 min behandelt. Die Fluoreszenz des AhR-GFP-Fusionsproteins (A), die Hoechst 33342-Färbung des Zellkerns (B) und der Umriss der Zelle (C) wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Aus Abbildung 18 geht hervor, dass alle drei Substanzen in HL-60 Zellen nach 45 min Behandlung eine Translokation des AhR-GFP in den Zellkern bewirken. Die Fluoreszenz (A)

ist im Gegensatz zur DMSO Behandlung in allen drei Fällen deckungsgleich mit der Hoechst Färbung des Zellkerns (B). Die Bilder im Durchlicht (C) deuten die Form des verhältnismäßig großen Zellkerns ebenfalls an. Dies zeigt, dass Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin den AhR aktivieren und seine Translokation in den Zellkern induzieren.

2.5 Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin induzieren das Zielgen Cyp1a1 des AhR in HL-60 Zellen

Wie schon unter 2.3 gezeigt lässt sich mit Cyp1a1 das klassische Zielgen des AhR in HL-60 Zellen durch den hoch affinen AhR Liganden TCDD induzieren. Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin aktivieren den AhR in HL-60 Zellen, wie in Abb. 16 gezeigt und induzieren ebenfalls das klassische AhR Zielgen Cyp1a1 (Abb. 19). 50 μ M Curcumin induzieren Cyp1a1 mit ungefähr 11-fach am stärksten, 10 μ M Indirubin-3'-oxim ungefähr 6-fach und Quercetin 3-fach.

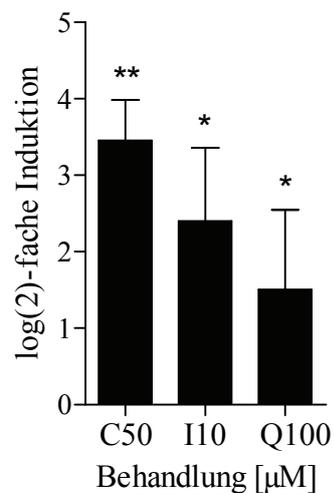


Abb. 19: Curcumin (C50), Indirubin-3'-oxim (I10) und Quercetin (Q100) induzieren Cyp1a1 mRNA nach 24 Stunden in HL-60 Zellen. HL-60 Zellen (5×10^6 /ml) wurden in 1 ml Medium in einer 24-well Platte für 24 h mit 50 μ M Curcumin (C50), 10 μ M Indirubin-3'-oxim (I10) und 100 μ M Quercetin (Q100) behandelt, die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben und RT-PCR durchgeführt. Dargestellt ist die log(2)-fache Induktion der basalen Expression der Kontrollbehandlung (DMSO) aus drei unabhängigen Versuchsreihen und deren Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit dem student's t-test berechnet: $P < 0,05 = *$; $P < 0,01 = **$; $P < 0,001 = ***$.

3. Blockieren des AhR in HL-60 Zellen

Um die Abhängigkeit der bisher gezeigten Effekte von Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin vom AhR zu zeigen musste die Bindung dieser Liganden an oder die Expression des AhR blockiert werden. In dieser Arbeit wurden dafür 3 Ansätze gewählt:

- Blockierung der Translation des AhR durch stabil ausgeprägte shRNA
- Blockierung der Translation des AhR durch siRNA
- Blockierung des AhR durch spezifische Antagonisten

3.1 Blockierung der Translation des AhR durch stabil exprimierte shRNA

Ein Plasmid, das stabil shRNA exprimiert, wurde durch virale Transduktion in HL-60 Zellen eingebracht. Diese Methode sollte die Schwierigkeiten bei der schlecht reproduzierbaren Transfektion von siRNA umgehen. Aufgrund der Weitergabe des shRNA-Konstrukts bei Zellteilung musste nur einmalig transduziert werden. Auch wenn die Transduktion an sich technisch aufwendiger war als eine Transfektion bedeutete eine erfolgreiche Transduktion eine HL-60 Zelllinie, die stabil shRNA exprimiert und damit die Translation des AhR dauerhaft inhibiert.

Um den Erfolg der Transduktion zu erhöhen wurden die Zellen zunächst in den S 2 Labors von Herrn Prof. Hanenberg an der Universität Düsseldorf unter Selektionsdruck mit G418 (Geneticin) kultiviert, da die eingebrachten Plasmide ein Resistenzgen gegen G418 (Bar-Nun, 1983) enthielten. Nach der Selektion konnten die Zellen auf die Expression der AhR mRNA getestet werden. Hierzu wurde RT-PCR durchgeführt und die Ergebnisse mit denen der Zellen verglichen, die das selektierbare Kontrollplasmid enthielten. Es wurden zwei Kontrollzelllinien erstellt: Die eine wurde mit einem Plasmid transduziert das für eine „Nonsense“ shRNA kodierte, die andere wurde mit einem sogenannten leeren Vektor transduziert, der alle Informationen enthielt jedoch nicht für eine shRNA kodierte. Somit überlebten alle drei Zelllinien die Selektion, jedoch nur die Zelllinie mit der shRNA gegen die AhR mRNA sollte eine verminderte Expression des AhR aufweisen. Von jeder Zelllinie wurden zwei Ansätze selektiert, so dass insgesamt sechs Ansätze vorlagen.

Abbildung 20 macht deutlich, dass entweder die Transduktion der HL-60 Zellen oder die Selektion mit G418 einen Einfluss auf die Expression der AhR mRNA hatte. Während zwischen den Zellen, die AhR shRNA exprimieren und den Kontrollgruppen keine

signifikanten Unterschiede zu erkennen sind, zeigten alle drei transduzierten und selektionierten Gruppen eine verminderte AhR mRNA Expression im Vergleich zu nicht transduzierten und nicht selektionierten Zellen.

Dieses Ergebnis machte die stabile Expression von AhR shRNA zur Inhibierung der AhR Translation zu einem unbrauchbaren Ansatz in HL-60 Zellen.

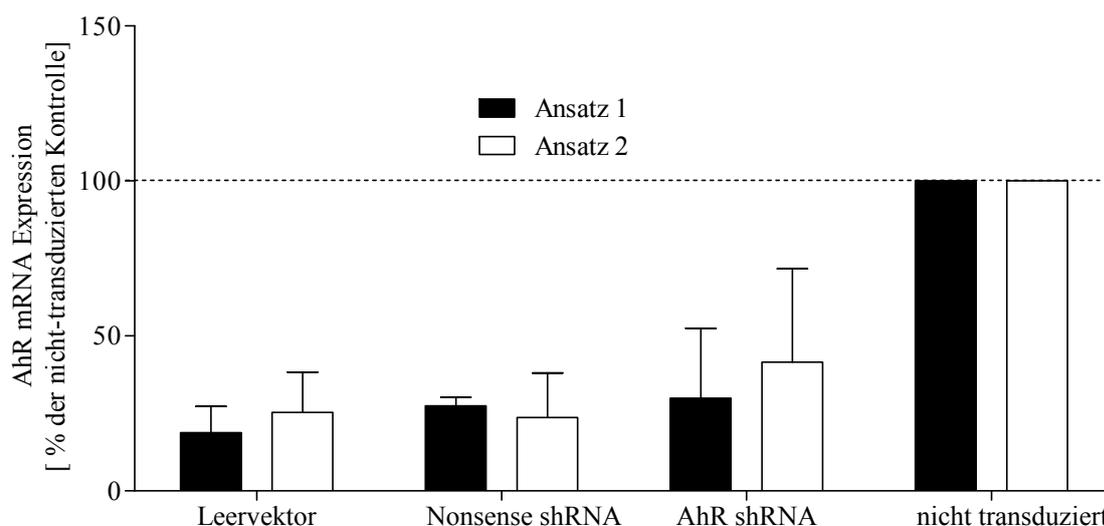


Abb. 20: Die Transduktion oder Selektion mit G418 von HL-60 Zellen hat eine Wirkung auf die Expression von AhR mRNA. HL-60 Zellen wurden transduziert und mit G418 so lange selektiert, bis Zellen ohne Resistenz vollständig abgestorben waren. Nach Isolierung der mRNA und Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe der RT-PCR die verbliebene AhR mRNA bestimmt. Dargestellt sind jeweils technische Duplikate einer Probe mit Standardabweichung.

3.2 Blockierung der AhR Translation durch siRNA

Die Zellen wurden wie unter 2.1.8.1 beschrieben mit siRNA transfiziert und nach 48 h die AhR mRNA und die basale mRNA von Cyp1a1 mit Hilfe der RT-PCR bestimmt (Abb. 21). Die Halbwertszeit des AhR Proteins beträgt ca. 28 h (Ma, 2002), somit wurden bei erfolgreichem siRNA Einsatz erst nach etwa 48 h signifikante Ergebnisse erwartet.

Die Abbildungen 21 und 22 zeigen eine unregelmäßige Expression des AhR nach den siRNA Experimenten. Die AhR mRNA Expression (Abb. 21) konnte nur 3 von 11 Experimenten unter 30 % der Expression der „Nonsense“ Kontrolle reguliert werden. Dieser Wert wurde

angestrebt, da eine deutliche Reduktion des AhR für signifikante Effekte benötigt wurde. Die Expression des AhR Proteins (Abb. 22) wurde nur in einem von 4 Experimenten unter 30 % der Kontrolle reguliert.

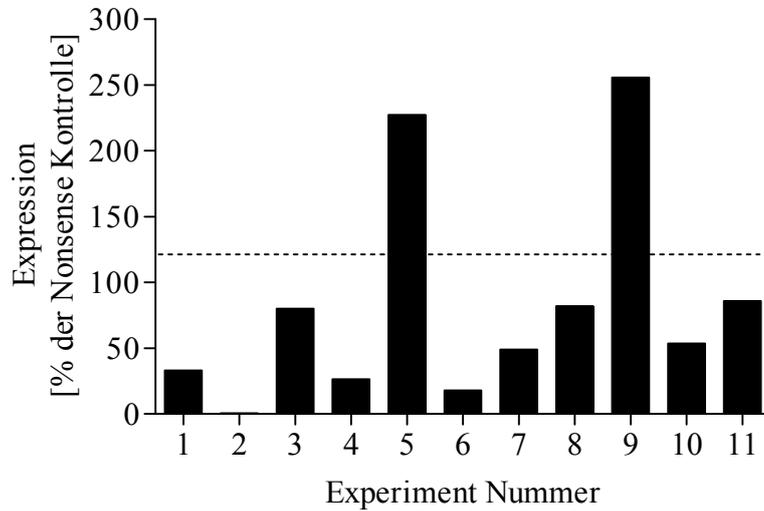


Abb. 21: Expression von AhR mRNA in HL-60 Zellen 48 Stunden nach Transfektion mit AhR siRNA. HL-60 Zellen wurden mit AhR-siRNA transfiziert und 48 h nach der Transfektion die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Mit RT-PCR wurde der verbeliebene Gehalt an AhR mRNA bestimmt. Dargestellt sind die technischen Duplikate der Transfektionen von 11 aufeinanderfolgenden Tagen.

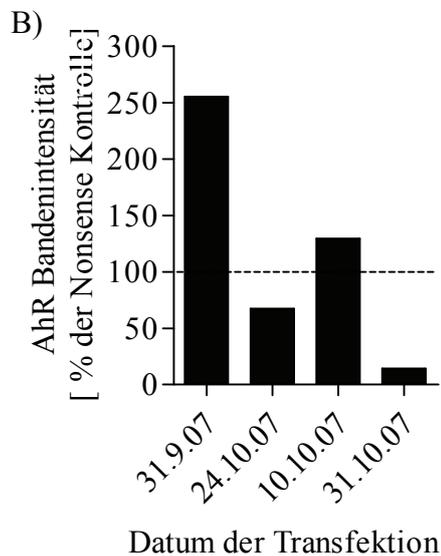
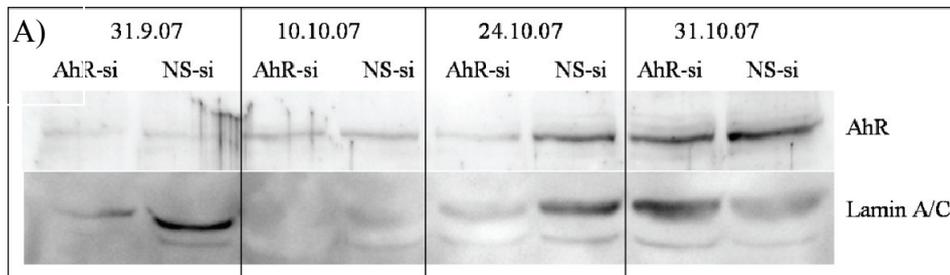


Abb. 22: Expression des AhR Proteins 48 h nach der siRNA Transfektion in HL-60 Zellen. HL-60 Zellen wurden mit AhR-siRNA und NS-siRNA transfiziert und nach 48 h die Proteine isoliert. Die Expression des AhR Proteins wurde mit Hilfe des AhR-AK mittels Western-Blot bestimmt (A) und anhand des Lamin-AK im Vergleich zur Kontrolle quantifiziert (B).

Die unterschiedlichen Ergebnisse auf Transkriptions- und Translationsebene zeigen die schlechte Reproduzierbarkeit der siRNA Transfektion in HL-60 Zellen. Obwohl immer unter konstanten Bedingungen gearbeitet wurde, wurden an kurz aufeinander folgenden Tagen, also nach nahezu gleicher Anzahl an Passagierungsvorgängen, sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielt.

Es wurden folgende Parameter konstant gehalten:

- **Zelldichte:** Es wurden 3×10^6 Zellen/100 μ l transfiziert
- **Volumen:** Es wurde immer in 100 μ l transfiziert
- **siRNA:** Es wurden 10 μ l siRNA (20 μ M) transfiziert
- **Uhrzeit:** Es wurde immer zwischen 10:00 Uhr und 11:00 Uhr transfiziert
- **Kultivierung:** Es wurde immer 3 Tage nach Kultivierungsbeginn transfiziert
- **Anfangszelldichte:** Es wurden immer 5×10^5 Zellen/ ml ausgesät
- **Bedingungen:** Die Kultivierungsbedingungen (Medium, Temperatur, etc.) waren immer konstant

Die schlechte Reproduzierbarkeit trotz konstanter Bedingungen machte die Blockierung der AhR Translation durch siRNA zu einem für dieses Zellsystem unbrauchbaren Ansatz.

3.3 Blockierung des AhR durch spezifische Antagonisten

Alpha Naphtoflavon (α NF) und 3'Methoxy-4'Nitroflavon (MNF) sind AhR Antagonisten, die die Aktivierung und Expression von Zielgenen des AhR blockieren können. Die Antagonisten lagern sich hierbei an die Ligandenbindestelle des AhR an, verhindern so die Binding von Agonisten, die Aktivierung des AhR und die daraus folgende Translokation in Zellkern (Henry, 1999). Diese Wirkung der AhR Antagonisten α NF und MNF sollte genutzt werden, um die Abhängigkeit der Ergebnisse vom AhR zu untersuchen. Da α NF und MNF sowohl zell- als auch konzentrationsabhängig wirken (Henry, 1999) musste zunächst gezeigt werden, ob sie in HL-60 Zellen als Antagonisten eingesetzt werden konnten. In vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass 50 μ M Curcumin das Zielgen des AhR, Cyp1a1 auf RNA Ebene in HL-60 Zellen am stärksten induzieren (2.5). Die starke Cyp1a1 Induktion durch Curcumin diente nun als Kontrolle für die antagonistische Wirkung von α NF und MNF. Da MNF als hochspezifisch beschrieben ist (Zhang, 2003c) wurde zunächst mit diesem Antagonisten eine

Konzentrationsreihe erstellt und die Hemmung der Cyp1a1 Expression durch RT-PCR bestimmt (Abb. 23). Hierzu wurden die Zellen 1 h mit verschiedenen Konzentrationen an MNF vorbehandelt und anschließend für 24 h 10 μM bzw. 50 μM Curcumin hinzugegeben. Durch die Vorbehandlung wurde sicher gestellt, dass MNF die Bindungsstelle des AhR blockieren kann, da die Bindungsaffinitäten von MNF und Curcumin an den AhR nicht bekannt sind und eine kompetetive Hemmung verhindert werden sollte. Als Kontrollen dienten die Behandlungen mit DMSO.

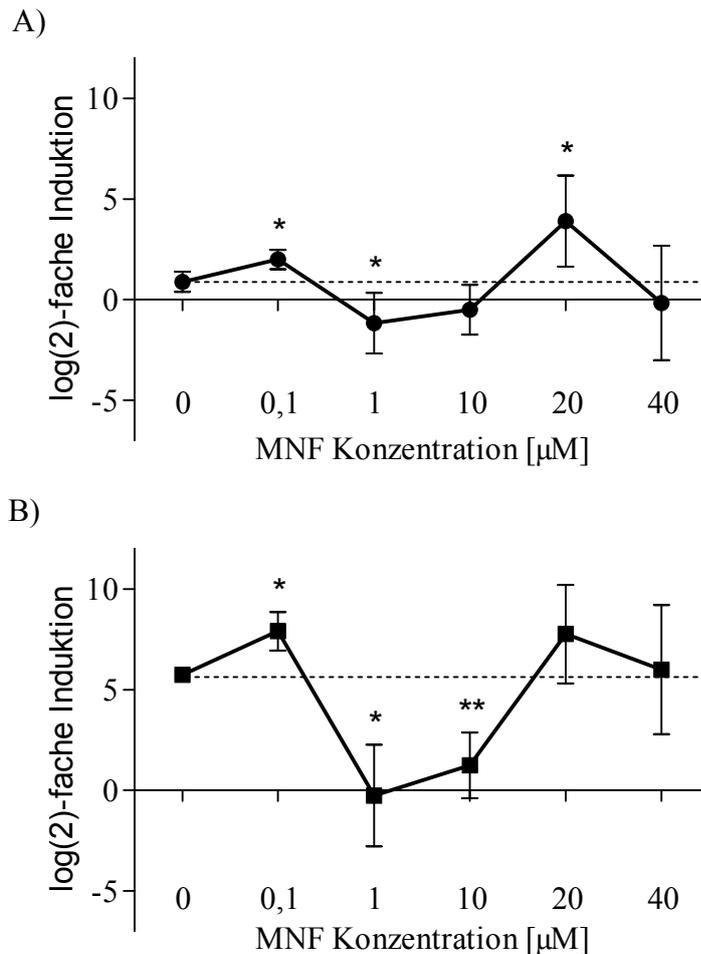


Abb. 23: MNF wirkt konzentrationsabhängig in HL-60 Zellen sowohl als AhR Antagonist, als auch als AhR Agonist. HL-60 Zellen ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden in 1 ml Medium in einer 24-well Platte für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen von MNF vorinkubiert und anschließend für 24 h mit 10 μM (A) oder 50 μM (B) Curcumin behandelt. Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und RT-PCR durchgeführt. Dargestellt ist die log(2)-fache Induktion der basalen Expression der Kontrollbehandlung (DMSO) aus drei unabhängigen Versuchsreihen und deren Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit dem student's t-test berechnet: $P < 0,05 = *$; $P < 0,01 = **$; $P < 0,001 = ***$.

Die MNF Konzentrationsreihe zeigt, dass MNF in den Konzentrationen 1 und 10 μM in HL-60 Zellen als AhR Antagonist wirkt, also die Induzierbarkeit des AhR Zielgens Cyp1a1 blockiert. Die Induktion von Cyp1a1 bei den anderen gewählten MNF Konzentrationen unter 1 und über 10 μM über den Wert der Einzelbehandlung mit Curcumin verdeutlichen, wie konzentrationsabhängig die antagonistische Wirkung ist, da MNF in diesen Fällen synergistisch also agonistisch auf die Cyp1a1 Induktion wirkt. Für weitere Experimente wurde 1 μM MNF und ebenfalls 1 μM αNF als antagonistische Konzentration gewählt.

Die antagonistische Wirkung von MNF und αNF auf die Induzierbarkeit von Cyp1a1 durch Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin ist in Abb. 24 dargestellt.

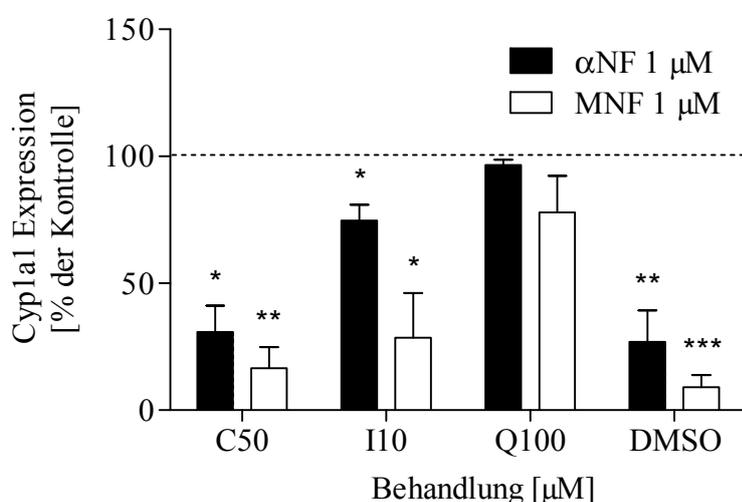


Abb. 24: Die AhR Antagonisten αNF und MNF blockieren die basale Cyp1a1 Expression und die Cyp1a1 Induktion durch Curcumin und Indirubin-3'-oxim. HL-60 Zellen ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden in 1 ml Medium in einer 24-well Platte für 1 h mit 1 μM αNF oder 1 μM MNF vorinkubiert und anschließend für 24 h mit 50 μM Curcumin (C50), 10 μM Indirubin-3'-oxim (I10) und 100 μM Quercetin (Q100) behandelt. Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und RT-PCR durchgeführt. Dargestellt ist die Cyp1a1 Expression in Prozent der basalen Expression der Kontrollbehandlung (DMSO) aus drei unabhängigen Versuchsreihen und deren Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit dem student's t-test berechnet: $P < 0,05 = *$; $P < 0,01 = **$; $P < 0,001 = ***$.

Es wird deutlich, dass sowohl die basale Cyp1a1 Expression DMSO behandelter Zellen, als auch die Expression nach Behandlung mit Curcumin und Indirubin-3'-oxim durch αNF und MNF in HL-60 Zellen signifikant inhibiert werden kann. Die durch Quercetin induzierte Expression von Cyp1a1 ist entweder durch die gewählten Konzentrationen oder die gewählten Antagonisten in HL-60 Zellen nicht signifikant inhibierbar, obwohl die Vorbehandlung mit MNF eine tendenzielle Blockierung erkennen lässt.

Für die folgenden Versuche zur Blockierung des AhR wurde die Behandlung mit den Antagonisten α NF und MNF verwendet.

4. Beteiligung des AhR an den Effekten von Curcumin und Indirubin-3'-oxim in HL-60 Zellen

In 3.3 konnte gezeigt werden, dass α NF und MNF die Expression des Zielgens des AhR Cyp1a1 nach Induktion durch Curcumin und Indirubin-3'-oxim inhibieren konnten. Für die Cyp1a1 Induktion durch Quercetin traf dies nicht zu. Im Folgenden wurde somit nur noch die Behandlungen mit Curcumin und Indirubin-3'-oxim auf eine AhR Abhängigkeit untersucht werden.

4.1 Der AhR ist nicht an der wachstumshemmenden Wirkung von Curcumin und Indirubin-3'-oxim auf HL-60 Zellen beteiligt

Zur Abschätzung der AhR Beteiligung an der wachstumshemmenden Wirkung von Curcumin und Indirubin-3'-oxim wurden HL-60 Zellen für 1h mit α NF bzw. MNF vorbehandelt und für weitere 24 h jeweils die beiden Substanzen zugegeben. Der MTT Assay brachte die in Abbildung 25 dargestellten Ergebnisse.

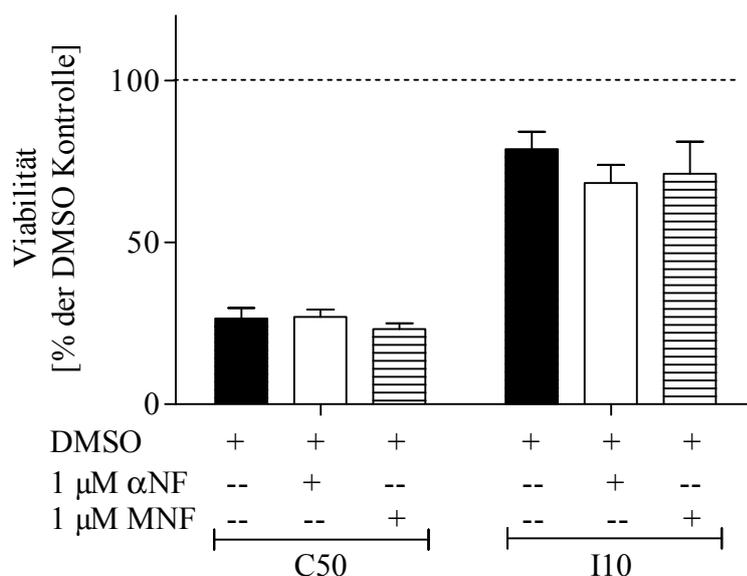


Abb. 25: Die AhR Antagonisten α NF und MNF bewirken keine Veränderung der wachstumshemmenden Wirkung von Curcumin (C50) und Indirubin-3'-oxim (I10) auf HL-60 Zellen. HL-60 Zellen (5×10^6 /ml) wurden in 100 μ l Medium in einer 96-well Platte für 1 h mit 1 μ M α NF oder 1 μ M MNF vorinkubiert, 24 h mit 50 μ M Curcumin (C50) oder 10 μ M Indirubin-3'-oxim (I10) behandelt und mittels MTT Assay ihre Viabilität bestimmt. Dargestellt ist die Viabilität in Prozent zur Kontrollbehandlung (DMSO) aus drei unabhängigen Versuchsreihen und deren Standardabweichungen.

Aus der Grafik ist ersichtlich, dass weder α NF noch MNF einen Einfluss auf die wachstumshemmende Wirkung von Curcumin oder Indirubin-3'-oxim haben. Die Wachstumshemmung war jedoch der entscheidende Parameter für die antileukämische Wirkung der Substanzen, da sie den Ausleseparameter und das Ziel einer antileukämischen Behandlung darstellt, nämlich das Wachstum und somit die Ausbreitung entarteter Zellen zu inhibieren. Die Versuchsreihen wurden jedoch fortgeführt, um auch die Effekte, die in ihrem Ausmaß keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität zeigten, ermitteln und die Wirkmechanismen der untersuchten Substanzen genauer spezifizieren zu können.

4.2 Der AhR ist an der Induktion der Effektorcaspasen 3/7 durch Curcumin beteiligt

Um die Beteiligung des AhR an der Induktion der Caspasen zu messen, wurden HL-60 Zellen mit den Antagonisten vorbehandelt und anschließend die Caspaseaktivität luminometrisch bestimmt (Abb. 26).

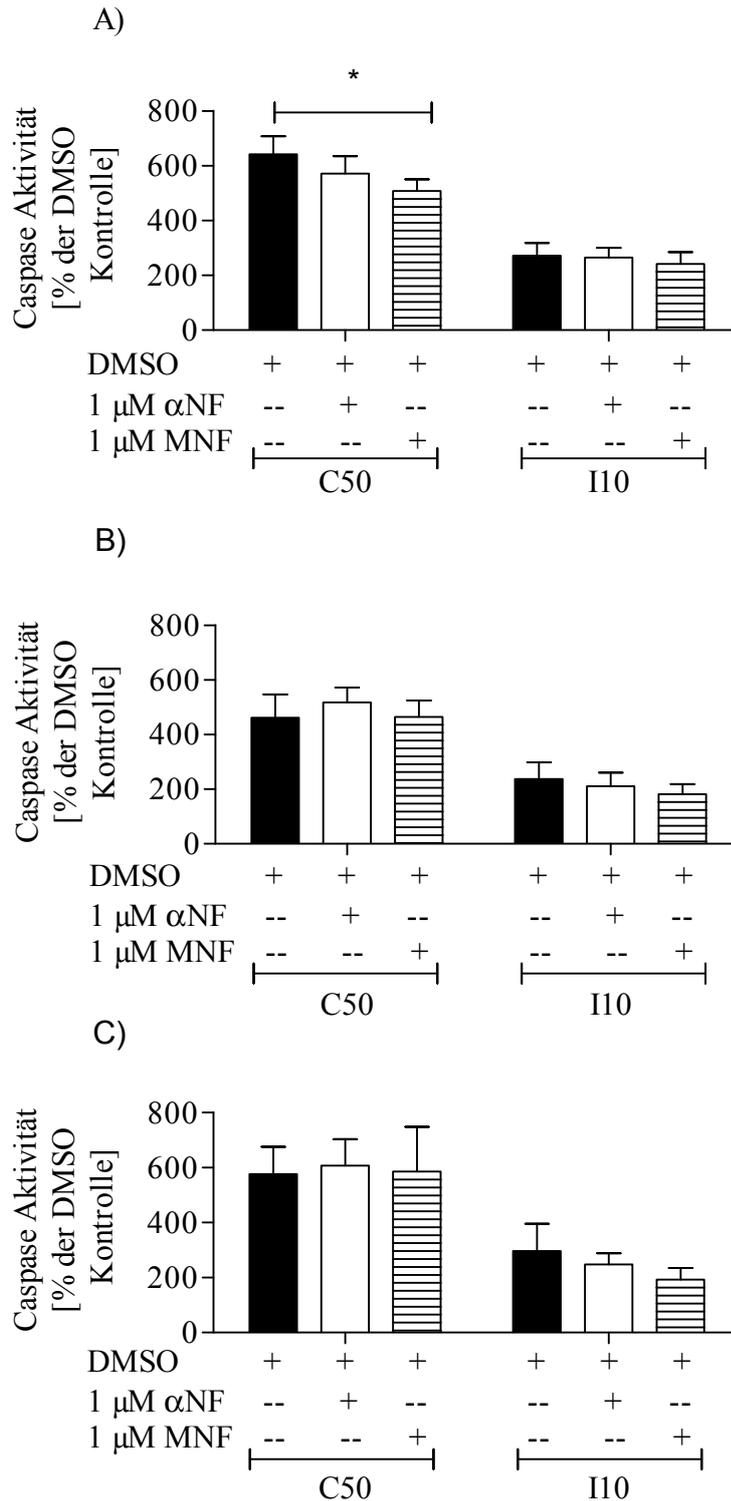


Abb. 26: Nur die Caspase 3/7 Induktion durch Curcumin wird durch die Vorbehandlung mit MNF teilweise inhibiert. HL-60 Zellen ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden in 100 μl Medium in einer 96-well Platte für 1 h mit 1 μM αNF oder 1 μM MNF vorinkubiert, 24 h mit 50 μM Curcumin (C50) oder 10 μM Indirubin-3'-oxim (I10) behandelt und mittels CaspaseGlo™ Assays die Caspaseaktivitäten bestimmt. Dargestellt sind die Aktivitäten der Caspasen 3/7 (A), 8 (B) und 9 (C) in Prozent zur Kontrollbehandlung (DMSO) aus drei unabhängigen Versuchsreihen und deren Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit dem student's t-test berechnet: $P < 0,05 = *$; $P < 0,01 = **$; $P < 0,001 = ***$.

Die Vorbehandlung mit den Antagonisten α NF und MNF zeigt im Fall der Caspase 3/7 eine signifikante Reduktion der Aktivität nach Behandlung mit Curcumin. Die Aktivität ohne Vorbehandlung betrug das $6,42 \pm 0,66$ -fache der basalen Caspaseaktivität, nach Vorbehandlung mit $1 \mu\text{M}$ MNF war die Aktivität auf das $5,07 \pm 0,43$ -fache reduziert. Dies bedeutet eine Reduktion um mehr als 21 %. Die Vorbehandlung mit α NF zeigte nach Curcumin Behandlung nur eine tendenzielle Reduktion, die nicht signifikant war. Weder die Induktion der Caspasen 8 und 9, noch die Caspase Induktion durch Indirubin-3'-oxim zeigte eine Abhängigkeit vom AhR.

4.3 Die Regulation der Gene der bcl-2 Familie geschieht in HL-60 Zellen unabhängig vom AhR

Bax ist in der Literatur als Zielgen des AhR beschrieben (Matikainen, 2001). Eine Blockierung des AhR durch die Antagonisten α NF und MNF ließe demnach eine Veränderung der Expression von bax und somit in dem Verhältnissen von bax/bcl-2 erwarten. Die Verschiebung der Verhältnisse von bax/bcl-2 und bad/bcl-xl, die durch Curcumin und Indirubin-3'-oxim Behandlung in HL-60 Zellen erfolgt wurde durch eine Vorbehandlung mit den Antagonisten jedoch nicht beeinflusst (Abb. 27).

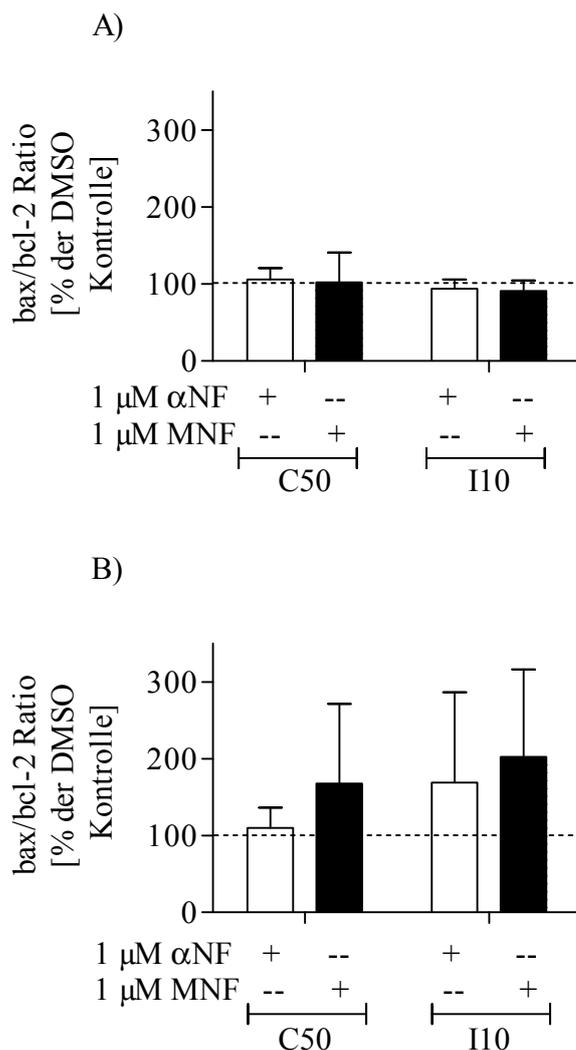


Abb. 27: Die Vorbehandlung mit den AhR Antagonisten hat keinen Einfluss auf die Expression der Gene der bcl-2 Familie. HL-60 Zellen ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden in 1 ml Medium in einer 24-well Platte für 1 h mit 1 μM αNF oder 1 μM MNF vorinkubiert, mit 50 μM Curcumin (C50) oder 10 μM Indirubin-3'-oxim (I10) für 24 h behandelt, die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben und RT-PCR durchgeführt. Dargestellt ist die Aufregulierung der Verhältnisse von bax/bcl-2 (A) und bad/bcl-xl (B) in Prozent der Kontrollbehandlung (DMSO) aus drei unabhängigen Versuchsreihen und deren Standardabweichungen.

4.4 Die Blockierung des AhR mit Antagonisten hat keinen Einfluss auf den Zellzyklus in

HL-60 Zellen

Curcumin und Indirubin-3'-oxim zeigten eine signifikante Aufregulierung der Zellzyklusinhibitoren p21 und p27. Daraus folgte für beide Substanzen eine Blockierung des Zellzyklus an unterschiedlichen Stellen, was durch die PI-Färbung gezeigt werden konnte. Eine Abhängigkeit dieser Regulation des Zellzyklus vom AhR würde nach Vorbehandlung

mit den AhR Antagonisten eine Abschwächung oder Verschiebung dieser Effekte zeigen. Die Induktion von p21 und p27 zeigten keine signifikanten Veränderungen nach der Blockierung des AhR (Abb. 28). Lediglich die Induktion durch Indirubin-3'-oxim konnte durch AhR Blockierung tendenziell inhibiert werden.

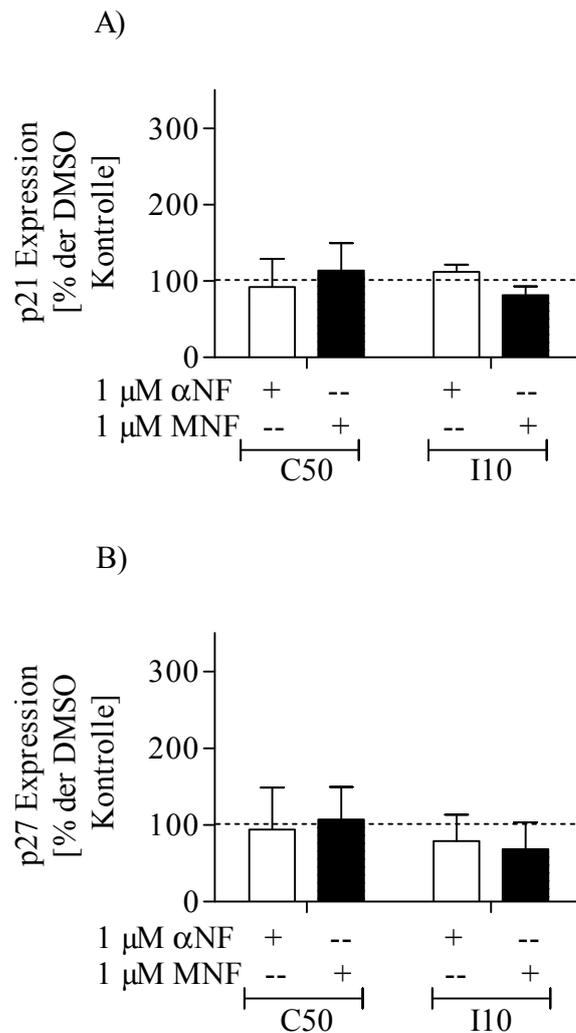


Abb. 28: Die Induktion der Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 durch Curcumin (C50) und Indirubin-3'-oxim (I10) in HL-60 Zellen wird durch Vorbehandlung mit AhR Antagonisten nicht beeinflusst. HL-60 Zellen (5×10^6 /ml) wurden in 1 ml Medium in einer 24-well Platte für 1 h mit 1 μM αNF oder 1 μM MNF vorinkubiert, mit 50 μM Curcumin (C50) oder 10 μM Indirubin-3'-oxim (I10) für 24 h behandelt, die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben und RT-PCR durchgeführt. Dargestellt ist die Expression in Prozent der Kontrollbehandlung (0,6% DMSO) aus drei unabhängigen Versuchsreihen und deren Standardabweichungen.

Die Blockierung des Zellzyklus und die Verteilung der Zellen auf die einzelnen Phasen durch Curcumin und Indirubin-3'-oxim Behandlung zeigte ebenfalls keine signifikanten Veränderungen nach Blockierung des AhR (Abb. 29).

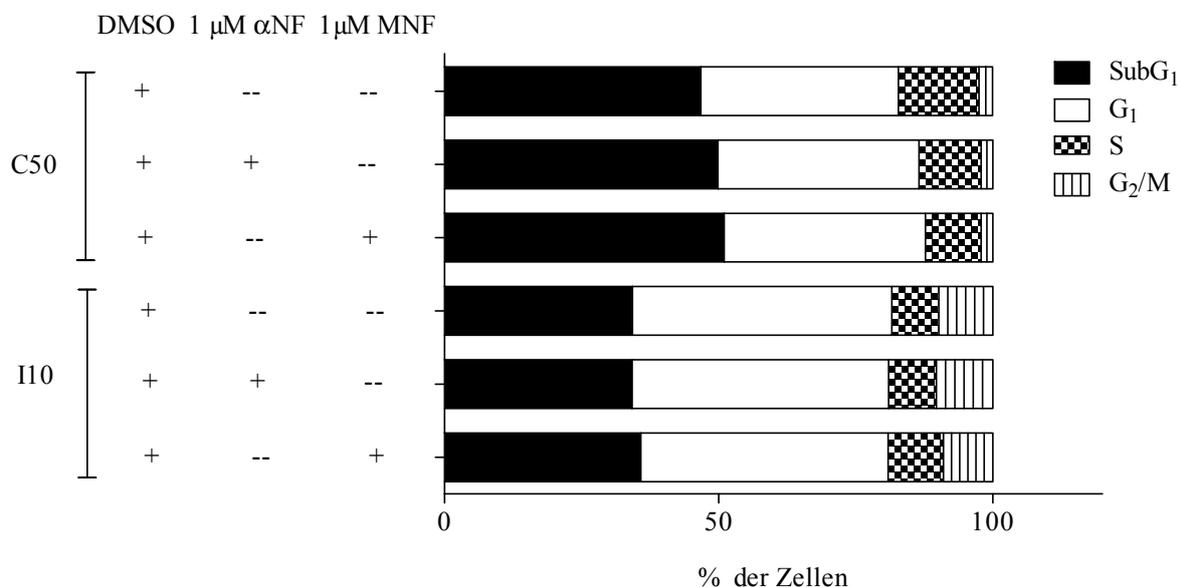


Abb. 29: Blockierung des AhR führt zu keiner Veränderung in der Zellzyklusverteilung von HL-60 Zellen nach Behandlung mit Curcumin (C50) oder Indirubin-3'-oxim (I10). HL-60 Zellen (5×10^6 / ml) wurden in 2 ml Medium in einer 12-well Platte für 1 h mit 1 μM αNF oder 1 μM MNF vorinkubiert, mit 50 μM Curcumin (C50) oder 10 μM Indirubin-3'-oxim (I10) für 24 h behandelt und nach Zugabe von 10 μM PI die Fluoreszenz am Durchflusszytometer vermessen. Dargestellt ist die Verteilung der Zellen in den Phasen des Zellzyklus in Prozent.

4.5 Die Reduzierung des ROS-Gehalts in HL-60 Zellen durch Curcumin und Indirubin-3'-oxim ist unabhängig vom AhR

Auch wenn die Inhibierung von ROS nicht als antileukämischer Effekt von Curcumin und Indirubin-3'-oxim angesehen wird, so sollte auch hier eine mögliche Abhängigkeit vom AhR untersucht werden. In der Literatur ist der AhR in bestimmten Zellsystemen im Zusammenhang mit der Generierung von ROS beschrieben (Barouki, 2007), also war es auch hier von Interesse in wieweit der AhR in HL-60 Zellen an der Regulierung von ROS beteiligt ist. HL-60 Zellen wurden mit den AhR Antagonisten vorbehandelt und der ROS-Gehalt nach der anschließenden Behandlung mit Curcumin und Indirubin-3'-oxim für 24 h erneut bestimmt. Weder die Reduzierung des ROS-Gehalts durch Curcumin noch durch Indirubin-3'-oxim wurde durch Blockierung des AhR beeinflusst (Abb. 30).

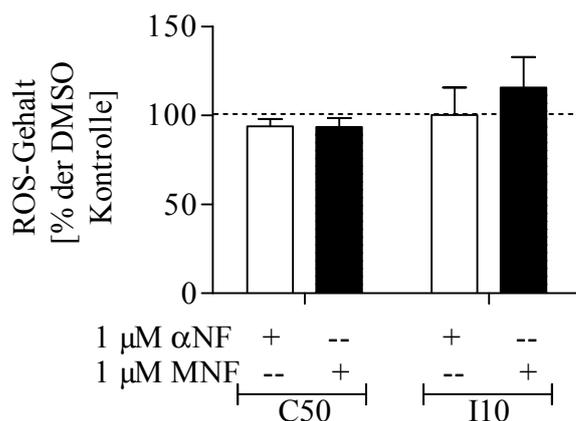


Abb. 30: Der AhR ist nicht an der Reduzierung des ROS-Gehalts durch Curcumin (C50) und Indirubin (I10) in HL-60 Zellen beteiligt. HL-60 Zellen (5×10^6 / ml) wurden in 2 ml Medium in einer 12-well Platte für 1 h mit 1 μ M α NF oder 1 μ M MNF vorinkubiert, mit 50 μ M Curcumin (C50) oder 10 μ M Indirubin-3'-oxim (I10) für 24 h behandelt und nach Zugabe von 10 μ M DCFA-DA die Fluoreszenz am Durchflusszytometer vermessen. Dargestellt ist der ROS-Gehalt der behandelten Zellen in Prozent der DMSO Kontrolle aus drei unabhängigen Versuchsreihen und deren Standardabweichungen.

5. Andere Signalwege die durch Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin beeinflusst werden

Die oben gezeigten Ergebnisse und die bisherige Literatur zu den drei Substanzen weisen darauf hin, dass ihre Effekte in HL-60 Zellen nicht auf einem einzigen Signalweg beruhen können. Für alle drei Substanzen sind verschiedenste Signalwege benannt, die in unterschiedlichen Zellsystemen aktiviert werden. In dieser Arbeit sind insbesondere Wege von Interesse, die die gezeigten Effekte wie Apoptoseinduktion und Zellzyklusinhibition vermitteln (Abb. 31).

Es wurden daher alternativ zum AhR Signalweg drei Gene untersucht, die zum einen schon mit einer oder mehrerer dieser Substanzen in anderen Zellsystemen in Verbindung gebracht wurden und zum anderen an Wachstumshemmenden oder antikanzerogenen Effekten in HL-60 Zellen beteiligt sind (James, 1999; Kanli, 2007; Li, 2005). Die Regulierung der drei gewählten Gene RelB, TGF- β und VDR wurde mittels RT-PCR untersucht (Abb. 32).

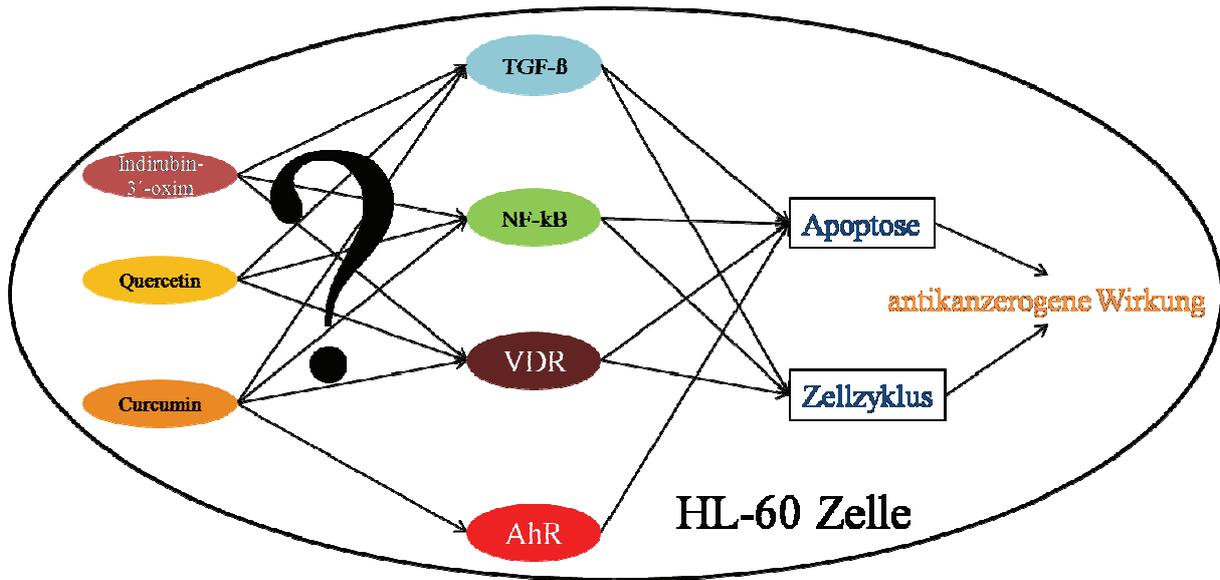


Abb. 31: Mögliche Signalwege, die an der Regulierung der Apoptose und des Zellzyklus durch Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin in HL-60 Zellen beteiligt sind.

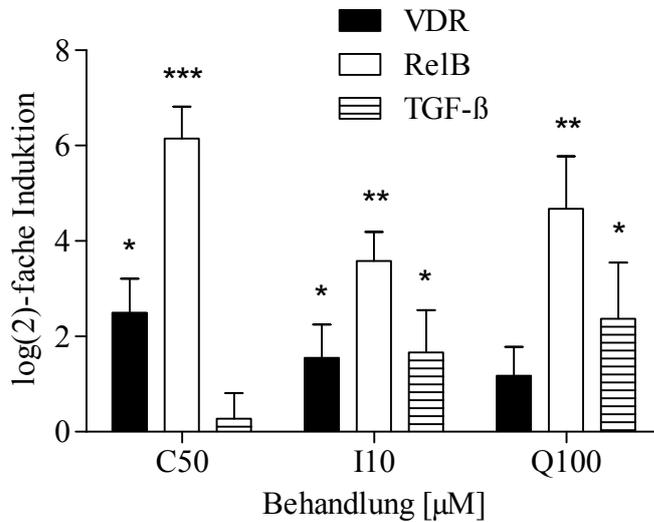


Abb. 32: Curcumin (C50), Indirubin-3'-oxim (I10) und Quercetin (Q100) induzieren Gene anderer Apoptosesignalwege. HL-60 Zellen (5×10^6 /ml) wurden in 1 ml Medium in einer 24-well Platte für 24 h mit 50 µM Curcumin (C50), 10 µM Indirubin-3'-oxim (I10) und 100 µM Quercetin (Q100) behandelt. Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und RT-PCR durchgeführt. Dargestellt ist die log(2)-fache Induktion der basalen Expression (DMSO) aus drei unabhängigen Versuchsreihen und deren Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit dem student's t-test berechnet: $P < 0,05 = *$; $P < 0,01 = **$; $P < 0,001 = ***$.

Am deutlichsten ist die signifikante Induktion der NF- κ B Untereinheit RelB durch alle drei Substanzen. Indirubin-3'-oxim induziert die RelB mRNA um das 12-fache, Quercetin um das 30 fache und Curcumin über 60-fach. Der VDR wird nur durch Curcumin und Indirubin-3'-oxim um jeweils ca. 4-fach signifikant induziert wogegen TGF- β nur durch Indirubin-3'-oxim und Quercetin ebenfalls ca. 4-fach induziert wird.

6. Microarrayanalyse von HL60 Zellen nach Curcumin Behandlung

6.1 Gene Ontology Analyse nach Curcumin Behandlung

In 5.2 wurde gezeigt, dass der AhR zu ca. 21 % an der Aktivierung der Effektorcaspasen 3/7 durch Curcumin in HL-60 Zellen beteiligt ist. Curcumin vermittelt seine Apoptose induzierenden Eigenschaften also nur teilweise über den AhR. Microarrayexperimente sollten nun eine umfassende Analyse des Expressionprofils von HL-60 Zellen nach Curcumin Behandlung möglich machen um andere Signalwege die an seinen antileukämischen Effekten beteiligt sind aufzuzeigen. HL-60 Zellen wurden wie in den Methoden beschrieben behandelt und die Microarray Experimente von zwei unabhängigen Behandlungen nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Durch eine Microarrayanalyse von über 22000 Genen und der anschließenden Berechnung der überrepräsentierten regulierten biologischen Prozesse mit einer „Gene Ontology“- Analyse (Martin, 2004) sollte der Frage nachgegangen werden welche anderen Signalwege durch Curcumin in HL-60 Zellen beeinflusst werden. Durch die Gene Ontology Analyse wurde der Datensatz auf die Häufigkeit regulierter Gene untersucht, die bestimmten biologischen Prozessen zugeordnet werden können. Ist ein hoher Anteil von Genen eines bestimmten biologischen Prozesses wie z.B. der Apoptose im Vergleich zur Gesamtzahl der untersuchten Gene dieses Prozesses reguliert, so wird dieser Prozess als überrepräsentiert bezeichnet.

Nach Curcumin Behandlung wurden 771 der 22000 Gene auf dem Chip als signifikant reguliert detektiert (Genliste s. Anhang Tab. 8). Abbildung 33 zeigt die überrepräsentierten Signalwege in HL-60 Zellen nach 24 h. Es sind sowohl übergeordnete als auch ausgewählte detailliertere Prozesse dargestellt. Curcumin regulierte in erster Linie den Metabolismus von Nukleinsäuren und Kofaktoren bzw. Koenzymen, die Biosynthese von Nukleosiden und den Katabolismus. Besonders überrepräsentiert war ebenfalls die Prozessierung von RNA und die Regulierung der Ribosomen. Die Apoptose und Regulierung des Zellzyklus war nicht

signifikant überrepräsentiert vertreten, jedoch ist bei beiden Prozessen eine tendenziell höhere relative Häufigkeit nach Curcumin Behandlung im Vergleich zum gesamten Chip zu beobachten.

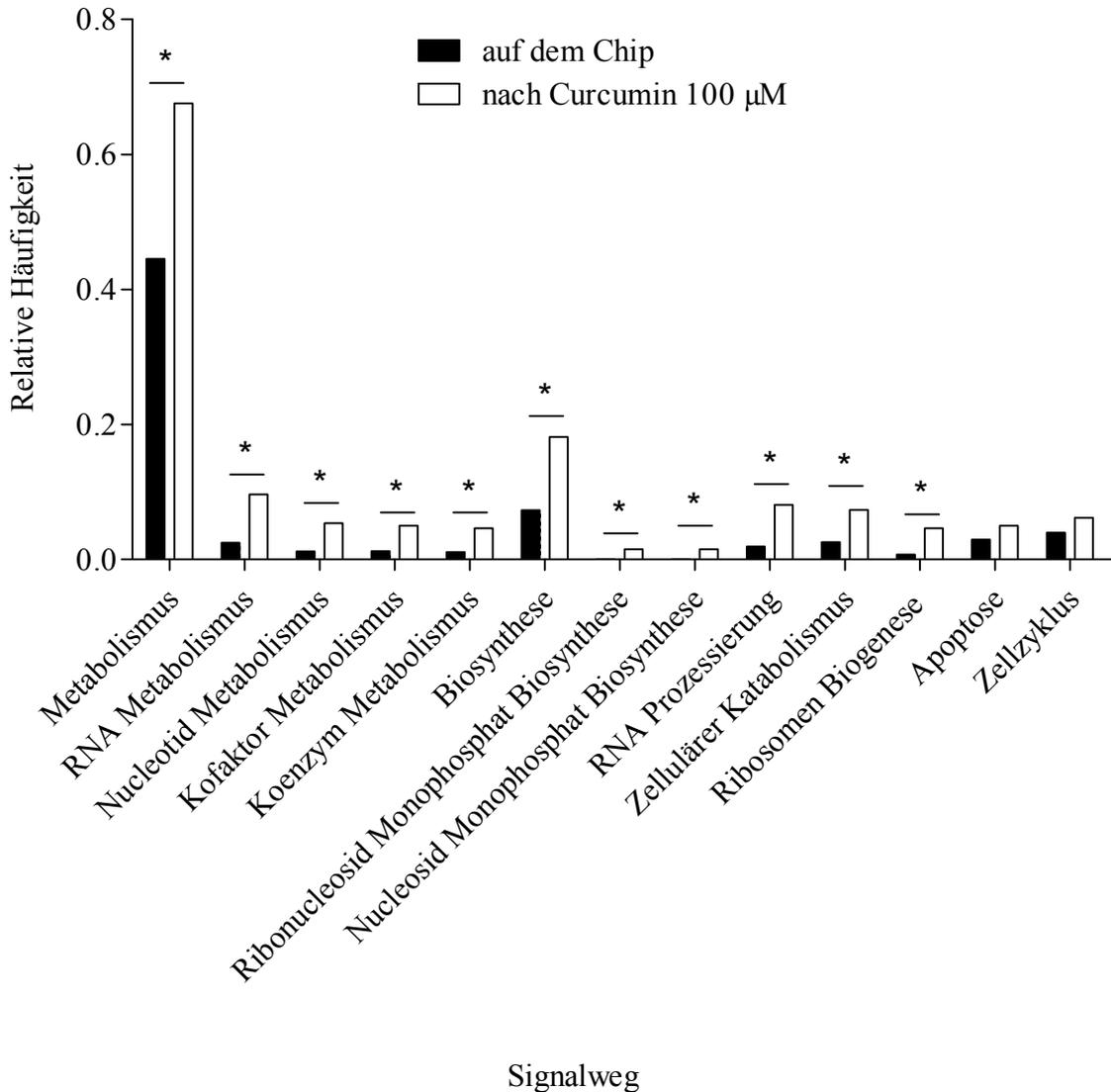


Abb. 33: GO-Analyse der Expression von HL-60 Zellen nach 24 h Curcumin Behandlung. HL-60 Zellen (5×10^6 /ml) wurden in 5 ml Medium in Zellkulturflaschen für 24 h mit 100 µM Curcumin behandelt und die isolierte mRNA biotinyliert. Nach der Microarrayanalyse wurden die erhaltenen Daten zur GO-Analyse eingesetzt und die signifikant überrepräsentierten Biologischen Prozesse ermittelt: $P < 0,05 = *$. Dargestellt sind die relativen Häufigkeiten der Prozesse auf dem Chip und nach Behandlung mit Curcumin.

6.2 Validierung der Microarraydaten

Um den Erfolg und damit die Aussagekraft des Microarrayexperiments beurteilen zu können wurden die erhaltenen Daten vor der weiteren Verarbeitung stichprobenartig mit RT-PCR validiert. Hierzu wurden 10 Gene ausgewählt, die sowohl stark als auch schwach induziert oder inhibiert wurden und ein nicht reguliertes Gen um die gesamte Bandbreite an Signalen abzudecken. Unter diesen Genen befand sich auch die NAD(P)H:Quinon Oxidoreduktase 1 (NQO1), ein gut untersuchtes Zielgen des AhR (Brauze, 2006), als Positivkontrolle für die Aktivierung des AhR durch Curcumin. Aus Abbildung 34 ist ersichtlich, dass die Regulierung aller Gene in derselben Weise auf dem Array und in der RT-PCR detektiert wurde. Die Signale der RT-PCR sind in den meisten Fällen ausgeprägter, da die Hybridisierung der RNA auf dem Microarray weniger sensitiv ist, als ihre Detektion mittels RT-PCR.

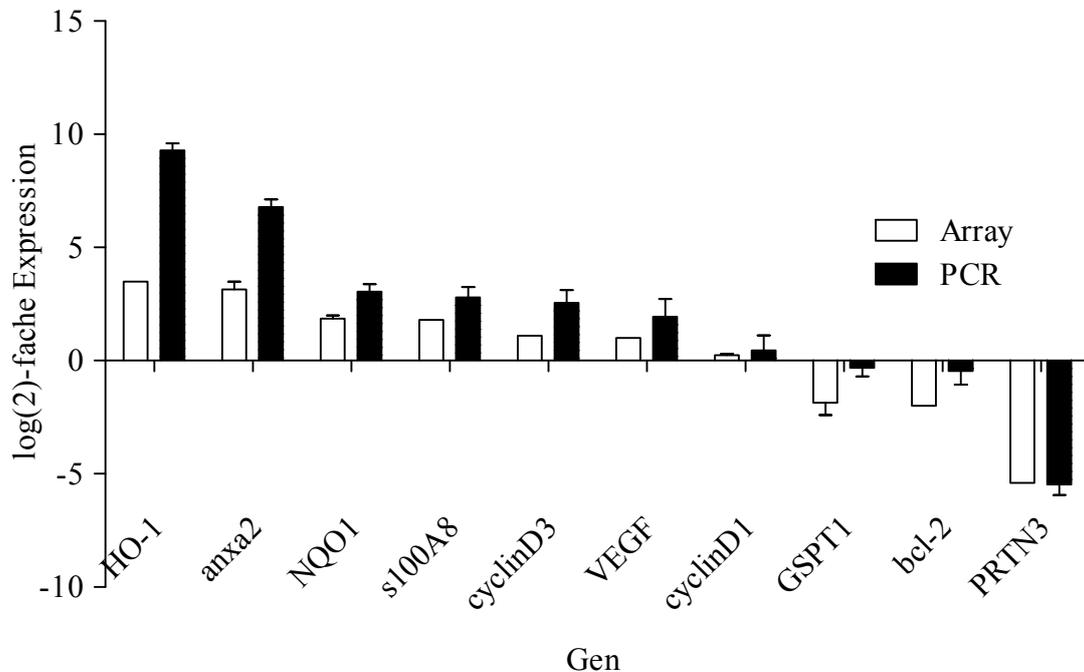


Abb. 34: Die Regulierung der stichprobenartig ausgewählten Gene auf dem Microarray konnte mittels RT-PCR validiert werden. HL-60 Zellen (5×10^6 /ml) wurden in 1 ml Medium in einer 24-well Platte für 24 h mit 100 μ M Curcumin oder DMSO als Kontrolle behandelt. Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und RT-PCR durchgeführt. Dargestellt ist die log₂-fache Expression der basalen Expression (DMSO) aus drei (RT-PCR) bzw. zwei (Array) unabhängigen Versuchsreihen und deren Standardabweichungen.

6.3 Vergleich der eigenen Microarraydaten mit anderen Expressionsprofilen von HL-60 Zellen

In Abb. 32 wurde gezeigt, dass Curcumin VDR und RelB mRNA von HL-60 Zellen induziert. Um den Einfluss von Curcumin auf HL-60 Zellen mit dem Einfluss anderer Substanzen zu vergleichen, die nachweislich bestimmte Signalwege aktivieren wurden die eigenen Microarraydaten mit Expressionsprofilen von mit unterschiedlichen Substanzen behandelten HL-60 Zellen verglichen, die im Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) öffentlich zur Verfügung stehen. Hierbei wurden für eine optimale Vergleichbarkeit nur Versuchsreihen ausgewählt, die mit dem gleichen Chip (HG-U133_A2) durchgeführt wurden.

Abbildung 35 stellt den Vergleich dieser Expressionsprofile in einer sogenannten Heatmap dar. Die Expressionsänderung der Gene wird durch einen Farbcode dargestellt, wobei grün für eine Suppression und rot für eine Induktion der Gene steht. Der Farbbalken über den Behandlungsbeschriftungen zeigt welche Farbtintensität für welchen Faktor steht. Ähnliche Profile werden in sogenannte „Cluster“ gefasst. Diese Cluster werden durch die eckigen Klammern oberhalb der Heatmap gekennzeichnet. Je ähnlicher zwei Profile sind, desto näher zueinander werden sie in der Heatmap dargestellt und desto kleiner werden die Klammern, die sie verbinden. Die in dieser Arbeit durchgeführte Behandlung mit Curcumin ist in der Abbildung rechts dargestellt. Der rote Kasten zeigt, welche Expressionsprofile der Behandlung mit Curcumin am ähnlichsten sind. Zum einen ist dies die Positivkontrolle (All-trans-Retinolsäure) dieser Datenreihe, zum anderen ist es die Behandlung mit dem VDR Agonisten 1,25-Dihydroxy-Vitamin D3 (VD3). Diese drei Behandlungen bilden ein separiertes Cluster, was anhand des Farbverlaufs der Heatmap gut nachzuvollziehen ist. Die Behandlung mit dem AhR Liganden TCDD (grüner Kasten) ist weniger ähnlich zur Behandlung mit Curcumin als die Behandlung mit VD3, da sie sich in einem entfernteren Cluster befindet. Das erstellen der Heatmap wurde freundlicherweise von Dr. Markus Frericks (Karolinska Institut, Stockholm) durchgeführt.

Vergleicht man die Expressionsprofile der Behandlungen von HL-60 Zellen mit Curcumin und VD3, so zeigt sich, dass Curcumin 771 Gene reguliert und VD3 2226 (Abb. 36). Von den 771 Curcumin regulierten Genen werden 205 Gene ebenso von VD3 auf oder herunter reguliert. Dies entspricht mit 27 % mehr als einem Viertel der Curcumin regulierten Gene bei einer Gesamtzahl von über 22000 untersuchten Gene auf dem Chip.

Abbildung 33 zeigt eine Gene Ontology (GO)-Analyse mit der GOTOolbox (Martin, 2004). Hierbei wurden die durch Curcumin und VD3 regulierten Gene in Gruppen gemeinsamer biologischer Prozesse zusammengefasst. Das Venn-Diagramm zeigt die drei jeweils überrepräsentierten Gruppen biologischer Prozesse, die entweder durch Curcumin alleine, durch VD3 alleine oder von beiden Substanzen in gleicher Art reguliert wurden. Während für Curcumin eher die metabolischen und katabolischen Signalwege spezifisch waren, induzierte VD3 spezifisch Stress- und Immunantworten, sowie die Zellaktivierung allgemein. Beide Substanzen hatten gemeinsam in HL-60 Zellen die Beeinflussung der Caspaseaktivierung, der Differenzierung und der ribosomalen Regulation.

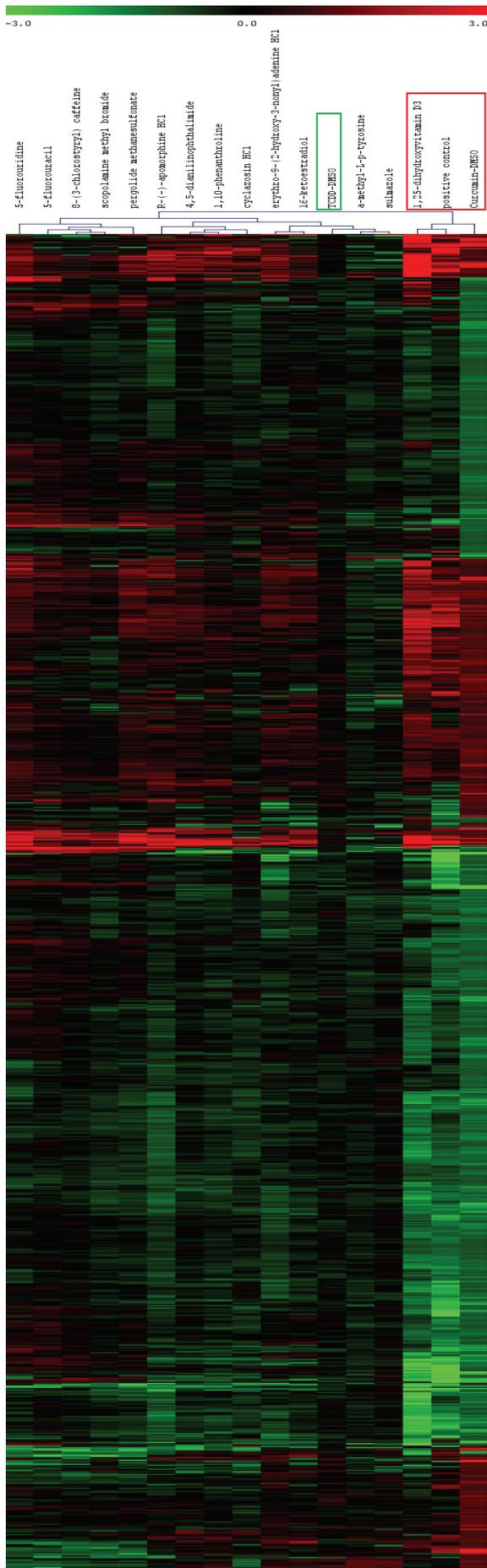


Abb. 35: Heatmap der Expressionprofile von HL-60 Zellen. HL-60 Zellen ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden in 5ml Medium in Zellkulturflaschen für 24 h mit $100 \mu\text{M}$ Curcumin behandelt und die isolierte mRNA wie in Material und Methoden beschrieben biotinyliert. Nach der Microarrayanalyse wurden die Ergebnisse mit 15 anderen Expressionsprofilen von HL-60 Zellen verglichen. Es besteht eine größere Übereinstimmung der Expressionsprofile nach Curcumin und 1,25 Dihydroxyvitamin D3 (VD3) Behandlung (roter Kasten), als zwischen Curcumin und TCDD (grüner Kasten) Behandlung. Die Positivkontrolle dieser Versuchsreihe war All-trans Retinolsäure (ATRA), die die Differenzierung von HL-60 Zellen induziert (Grande, 1995).

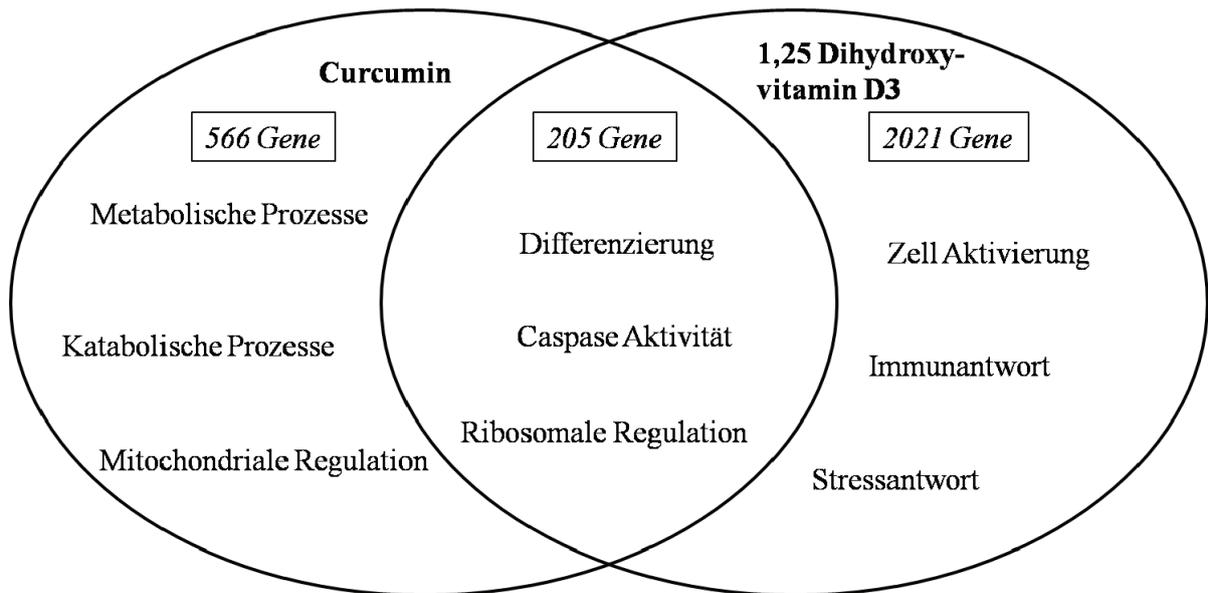


Abb. 36: 205 Gene werden in HL-60 Zellen durch Curcumin und VD3 in der gleichen Art reguliert. HL-60 Zellen ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden in 5ml Medium in Zellkulturflaschen für 24 h mit $100 \mu\text{M}$ Curcumin behandelt und die isolierte mRNA biotinyliert. Nach der Microarrayanalyse wurden die Ergebnisse mit anderen Expressionsprofilen von HL-60 Zellen verglichen. Dargestellt sind die drei jeweils überrepräsentiertesten biologischen Prozesse der jeweiligen Behandlung und der Schnittmenge aus beiden Behandlungen.

IV. Diskussion:

Natürlich vorkommende Substanzen wie sekundäre Pflanzenmetabolite rücken immer mehr in den Fokus der modernen Medizin. Flavonoide stellen eine bedeutende Gruppe der sekundären Pflanzenmetabolite dar, die mit dem Stoffwechsel von Phenolkörpern in Zusammenhang stehen (Hertog, 1993). Sie liefern zahlreiche Farbstoffe, die mehr oder minder intensiv gelb gefärbt sind und der ganzen Gruppe ihren Namen gaben (lat. *flavus* = gelb). Flavonoide fanden schon in der traditionellen Medizin ein breites Anwendungsspektrum und werden in der modernen Medizin mittlerweile in vielen klinischen Studien der Phasen I (z.B. Quercetin (Erlund, 2006)), II (z.B. Curcumin (Hsu, 2007)) und III (Phenoxodiol (Alvero, 2008)) eingesetzt. Das Wirkungsspektrum der Flavonoide ist groß, so hemmen sie das Wachstum von Bakterien und Viren, schützen vor freien Radikalen, Krebs und Herzinfarkt und wirken entzündungshemmend (Nandakumar, 2008). Eine weitere Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe bilden die Indole. Ein Indol ist ein aromatischer Heterocyclus, der als Strukturfragment in vielen Naturstoffen vorkommt und Grundbaustein für Farbstoffe, Hormone und Alkaloide ist. Der bekannteste vom Indol abstammende Farbstoff ist das Indigo, aber auch der antike Farbstoff Purpur ist ein solches Derivat (Christie, 2007). Indolderivate finden als pharmakodynamisch aktive Verbindungen und als Synthesebausteine in der pharmazeutischen Chemie eine vielfältige Verwendung. Für Indole sind antikanzerogene, antimikrobielle und cholesterinsenkende Eigenschaften beschrieben (Steriti, 2002). Die antikanzerogene Wirkung der Flavonoide und Indole ist in den meisten Fällen auf ihre Wirkung auf den Zellzyklus und den kontrollierten Zelltod (Apoptose) zurückzuführen. Einige Substanzen aus den Gruppen der Flavonoide und Indole werden als Liganden des Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) beschrieben (Adachi, 2001; Denison, 2003). Der AhR ist ein ligandenaktivierbarer Transkriptionsfaktor, der besonders bei der Aktivierung der Enzyme des Fremdstoffmetabolismus eine Rolle spielt. Für den AhR ist in der Literatur ebenfalls eine Beteiligung bei der Regulierung des Zellzyklus und der Apoptose beschrieben (Puga, 2002).

1. Durch welche Mechanismen wirken Curcumin, Quercetin und Indirubin-3'-oxim antileukämisch in HL-60 Zellen?

Zunächst sollte die antileukämische Wirkung der drei Substanzen in HL-60 Zellen nachgewiesen (Indirubin-3'-oxim), bzw. bestätigt (Curcumin und Quercetin) werden. Alle drei Substanzen zeigten starke wachstumshemmende Aktivität in HL-60 Zellen. Für Curcumin und Quercetin wurden hiermit bereits in HL-60 Zellen gezeigte Ergebnisse bestätigt (Chang, 2007; Pae, 2007), Indirubin-3'-oxim wurde erstmalig auf seine wachstumshemmende Wirkung in HL-60 Zellen untersucht. Entscheidend bei der Wahl der letztendlich eingesetzten Konzentration von 50 μM für Curcumin, 10 μM für Indirubin-3'-oxim und 100 μM für Quercetin waren neben den wachstumshemmenden Eigenschaften die Löslichkeit der Substanzen. Die maximal einzusetzende Konzentration des Lösungsmittels DMSO war die Konzentration, bei der weder ein toxischer Effekt auf die Zellen, noch ein Einfluss auf den AhR zu beobachten war. Für HL-60 Zellen betrug diese Konzentration 0,6 %. Bei dieser Konzentration wird für DMSO kein Einfluss auf die Expression oder Aktivität des AhR oder seiner Zielgene beschrieben (Nishimura, 2003). Mit den gewählten Konzentrationen konnte ebenfalls für Curcumin und Quercetin bestätigt und für Indirubin-3'-oxim erstmalig gezeigt werden, dass sie Apoptose in HL-60 Zellen induzieren.

Die Induktion des intrinsischen, also Mitochondrien vermittelten Apoptoseweges, ist abhängig von der Regulierung der Gene der bcl-2 Familie wie bcl-2, bcl-xl, bax oder bad. Für Indirubin-3'-oxim konnte die Verschiebung des bax/bcl-2 Verhältnis auf die Seite des proapoptotischen bax erstmalig in HL-60 Zellen gezeigt werden. Curcumin und Indirubin-3'-oxim regulierten das bax/bcl-2 Verhältnis unterschiedlich stark, senkten jedoch das $\Delta\Psi\text{m}$ gleichermaßen um ca. 30 %, was einen Zusammenbruch des Transmembranpotentials bedeutete. Die zusätzliche Regulierung von bad/bcl-xl durch Curcumin könnte die geringere bax/bcl-2 Regulierung ergänzt haben und führte somit zu Effekten der gleichen Intensität auf das $\Delta\Psi\text{m}$ wie Indirubin-3'-oxim. Dass die resultierende Caspase 9 Aktivität nach Indirubin-3'-oxim Behandlung geringer war als nach Curcumin Behandlung macht deutlich, dass noch andere Faktoren, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden einen Einfluss hierauf haben. Quercetin, das das bax/bcl-2 Verhältnis zu Gunsten des antiapoptotischen bax verschob, beeinflusste das $\Delta\Psi\text{m}$ nicht messbar, führte aber zu einer ähnlich starken Aktivierung der Caspase 9 wie Curcumin. Die unterschiedlichen Werte dieser Parameter bei gleichen Effekten auf die Aktivität der Caspase 9 zeigte die Vielfältigkeit der Faktoren, die den intrinsischen Apoptoseweg beeinflussen und die Vielfältigkeit der Wirkmechanismen von

Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin. Die drei Substanzen wirken also nicht gleichartig auf bestimmte Punkte in diesem komplizierten Geflecht, sondern aktivieren neben gleichen Angriffspunkten auch verschiedene unabhängige Wege zur Induktion der Apoptose. Als mögliche Ziele seien hier weitere Proteine aus der bcl-2 Familie wie z.B. das proapoptotische bak (Shankar, 2007) genannt, oder für Curcumin und Quercetin speziell ein Einfluss auf Erk, Akt oder PKC, die wiederum unter anderem das proapoptotische Protein bad aus der bcl-2 Familie regulieren (Granado-Serrano, 2006b; Woo, 2005). Indirubin-3'-oxim kann z.B. durch die Regulierung der Spaltung von Bid die Aktivität der Caspase 9 zusätzlich beeinflussen (Shi, 2008).

Dass alle drei Substanzen auch den extrinsischen Apoptoseweg beeinflussen zeigte die Induktion der Caspase 8 Aktivität. Es zeigte sich jedoch bei allen drei Substanzen eine geringere Aktivitätssteigerung als bei Caspase 9, also ein stärkerer Einfluss auf den intrinsischen Weg. Im Fall von Curcumin und Quercetin war auch hier eine stärkere Aktivierung der Caspase 8 zu beobachten als mit Indirubin-3'-oxim. Für Quercetin ist beschrieben, dass es die Rezeptor vermittelte Apoptose an unterschiedlichen Punkten wie der Akkumulierung von Todesrezeptoren oder der Dephosphorylierung von Akt verstärken kann (Granado-Serrano, 2006a), jedoch ist keine direkte Induktion über einen der Rezeptoren beschrieben. Für Curcumin und Indirubin-3'-oxim ist ebenfalls keine direkte Interaktion mit einem Todesrezeptor beschrieben, obwohl beide die Aktivität der Caspase 8 induzieren können (Karmakar, 2006; Shi, 2008). Zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Weg bestehen auch Interaktionen. Caspase 8 kann die Spaltung von Bid induzieren, das den intrinsischen Weg aktivieren kann. Zum anderen gibt es eine einseitige Rückkopplung der Caspase 3, die nach Aktivierung durch Caspase 9 Caspase 8 aktivieren kann (Hotchkiss, 2006). Diese Rückkopplung ist auch hier der wahrscheinlichste Mechanismus, da eine direkte Interaktion der drei Substanzen mit den Todesrezeptoren nicht beschrieben ist. Die Resultierende Caspase Aktivität, also die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 zeigte ein ähnliches Bild wie die Caspasen 8 und 9. Curcumin und Quercetin zeigten eine gleichermaßen starke und Indirubin-3'-oxim eine deutlich niedrigere Aktivierung der Caspasen. Diese ähnlichen Aktivierungsintensitäten deuten auf eine Rückkopplung des Signals von Caspase 9 über Caspase 3 auf Caspase 8 hin.

Ein weiterer Faktor für Unterschiede in den Wirkungsweisen sind die antioxidativen Eigenschaften der drei Substanzen. Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin führten alle gleichermaßen zu einer Reduzierung des ROS Gehalts in HL-60 Zellen. Mit dem

angewandten Assay wurde der Gesamtgehalt aller ROS bestimmt, jedoch nicht zwischen den einzelnen Arten von ROS (Superoxid Anion, Wasserstoffperoxide, Hydroxyl Radikale) unterschieden. In geringen Dosen können ROS auch als Signalgeber in zellulären Prozessen fungieren. So stimulieren ROS den Ca^{2+} -Signalweg oder die Phosphorylierung von Proteinen wie Serin- oder Threoninkinasen oder inhibieren Protein Phosphatasen (Suzuki, 1997). In höheren Dosen führen ROS meist zu oxidativen Schädigungen von Makromolekülen (Clerkin, 2008). Diese variablen Wirkungsweisen können dazu führen, dass ein Eingriff in den ROS-Haushalt der Zelle positive und negative Einflüsse auf die Zelle haben kann. Wird der ROS Gehalt in der Zelle erniedrigt, führt dies zum einen zu einer geringeren Schädigung der Zelle durch oxidative Prozesse und Radikale, zum anderen können oben genannte Signalwege in der Zelle durch fehlende ROS-Signalmoleküle gestört werden. Die antioxidativen Eigenschaften von Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin können durchaus spezifisch für bestimmte ROS und somit bestimmte Signalwege sein und somit können die drei Substanzen zwar gleichartig den Gesamtgehalt an ROS senken, jedoch unterschiedliche Folgen in den Zellen bewirken (Naka, 2008). Quercetin zeigte zwar die gleiche Regulierung der Gene *bax* zu *bcl-2* wie Curcumin und Indirubin-3'-oxim, jedoch nicht den erwarteten Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$. Obwohl alle Substanzen den gleichen Einfluss auf den Gesamtgehalt von ROS hatten, beeinflusst Quercetin damit andere Signalwege als Curcumin oder Indirubin-3'-oxim. Der proapoptischen Regulierung der *bcl-2* Gene durch Quercetin auf Transkriptionsebene, steht eine antiapoptische Regulierung auf Proteinebene durch antioxidative Prozesse an der Mitochondrienmembran gegenüber, die durch Curcumin und Indirubin-3'-oxim in diesem Maße nicht geschieht (Dorta, 2008).

Auch beim Einfluss der drei Substanzen auf den Zellzyklus zeigte sich, dass Unterschiede in den Wirkmechanismen der Substanzen existieren. Da für die Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 bekannt ist, dass sie in allen Phasen eine Blockade bewirken können (Pang, 2008) scheint hier das Verhältnis dieser beiden Inhibitoren und die Regulierung weiterer Inhibitoren wie p57 oder die INK4 Familie, die hier nicht untersucht wurden, für den Punkt der Blockade relevant zu sein. Während Curcumin und Quercetin nur in einer Phase des Zellzyklus blockierten, zeigte Indirubin-3'-oxim eine weitere nicht so starke Blockierung in der G_2/M -Phase. Die stärkere Induktion von p27 durch Curcumin im Vergleich zu den anderen beiden Substanzen könnte den Ausschlag geben nicht in der G_1 sondern in der G_2/M Phase den Zellzyklus zu blockieren. Die zusätzliche schwache Blockierung des Zellzyklus in der G_2/M -

Phase durch Indirubin-3'-oxim war somit ebenfalls durch die stärkere Induktion von p27 im Vergleich zu Quercetin zu erklären, das seinerseits p21 stärker induzierte.

2. Welche Rolle spielt der AhR bei der antileukämischen Wirkung von Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin?

Für die drei gewählten Substanzen konnte bestätigt (Curcumin, Quercetin) und erstmalig gezeigt werden (Indirubin-3'-oxim), dass sie in HL-60 Zellen wachstumshemmend wirken und Apoptose induzieren. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass HL-60 Zellen den AhR exprimieren und dass das AhR Zielgen Cyp1a1 durch den hoch affinen Liganden TCDD, Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin induzierbar ist. Wichtig zum Nachweis der AhR Abhängigkeit war es die Aktivierung des AhR in HL-60 Zellen blockieren zu können um seine Beteiligung an der antileukämischen Wirkung der Substanzen nachzuweisen. Es wurden grundlegend zwei verschiedene Ansätze gewählt um den AhR zu inhibieren, zum einen die Blockierung der Translation des AhR Proteins durch forcierten Abbau der AhR mRNA und zum anderen die Inhibition der Aktivierung des AhR durch Blockierung der Ligandenbindestelle mit hoch spezifischen AhR Antagonisten.

HL-60 Zellen erwiesen sich bei der Behandlung mit siRNA wie in der Literatur beschrieben als „hard to transfect cells“ (Guignet, 2008). Die schlechte Reproduzierbarkeit der Transfektion und Inhibierung der AhR Translation trotz einheitlicher Bedingungen bis hin zur Einhaltung der gleichen Tageszeit ist zum jetzigen Zeitpunkt der Wissenschaft noch schlecht untersucht. Selbst die Einhaltung der angegebenen Parameter reichte nicht aus, zu jedem Zeitpunkt der Transfektion Zellen von gleicher Beschaffenheit bearbeiten zu können. Durch kleinste Faktoren, wie dem Öffnen der Inkubatortür, Erschütterungen im Labor, etc. könnten die Zellen in einen veränderten Teilungsrythmus kommen und sich trotz der angenommenen Teilungsrate von ~24 h zu gleichen Zeitpunkten nach Ansetzen der Kultur in anderen Stadien befinden, die die Effizienz einer Transfektion begünstigen oder verschlechtern (He, 2006). Der Ansatz der Eliminierung der AhR mRNA durch siRNA konnte somit nicht zur Bearbeitung der Fragestellung eingesetzt werden.

Die Transduktion der HL-60 Zellen mit shRNA führte ebenfalls nicht zum Erfolg. Die Transduktion mit der Information zur Expression AhR mRNA spezifischer shRNA zeigte keinerlei Unterschiede in der AhR Expression im Vergleich zu den Kontrollansätzen. Dies

kann zum einen an der unzureichend erfolgten Transduktion, als auch an der Qualität der zur Transduktion verwendeten Materialien (Plasmiden) liegen. Da die Zellen resistent gegen G418 waren muss eine erfolgreiche Transduktion der Resistenzinformation, die ebenfalls auf den eingesetzten Plasmiden vorhanden war, stattgefunden haben. Es ist möglich, dass nur die Information zur Expression der AhR shRNA nicht erfolgreich Transduziert wurde, durch eventuelle Brüche oder Mutationen in den Plasmiden, oder dass diese Information in HL-60 Zellen nicht den Effekt hatte, wie er zuvor in anderen Menschlichen Zellen (HaCat) aufgetreten war (Kalmes, 2006). Es ist beschrieben, dass auch im Menschen Polymorphismen des AhR auftreten können (Harper, 2002). Ein Polymorphismus im AhR würde auch eine andere shRNA Sequenz zur Degradierung der AhR mRNA benötigen. Besteht dieser Unterschied in der AhR Sequenz zwischen den zuvor eingesetzten HaCat-Zellen und den in dieser Arbeit verwendeten HL-60 Zellen, erklärt dies die abweichenden Effizienzen in der Inhibierung der AhR Translation. Um dies zu bestätigen müssten die AhR Genabschnitte sequenziert werden. Der Ansatz der Eliminierung der AhR mRNA durch shRNA konnte aufgrund der mangelnden Effizienz ebenfalls nicht zur Bearbeitung der Fragestellung eingesetzt werden.

Die Blockierung der AhR Ligandenbindestelle durch die spezifischen AhR Antagonisten α -Naphthoflavon (α NF) und 3'Methoxy-4'Nitro-Flavon (MNF) sollte durch Veränderungen in der Cyp1a1 Expression gemessen werden. Hierbei zeigten beide Antagonisten Unterschiede in ihrem Potential die Expression der AhR Zielgene in HL-60 Zellen zu unterdrücken. Die Cyp1a1 Expression nach Quercetin Behandlung wurde tendenziell, aber nicht signifikant und nicht in einem Maße unterdrückt, dass in weiteren Versuchen sichtbare Veränderungen erwarten hätte lassen. Da der Nachweis der AhR Blockierung für Quercetin nicht erbracht werden konnte, wurde in den darauf folgenden Versuchen nur mit Curcumin und Indirubin-3'-oxim weitergearbeitet. Hier betrug die Restexpression von Cyp1a1 nach Vorbehandlung mit den Antagonisten $\leq 30\%$ (Ausnahme Indirubin-3'-oxim nach α NF Vorbehandlung) was ausreichend war, um von einem Einfluss auf AhR vermittelte Effekte auszugehen.

Für Indirubin-3'-oxim konnte in keinem Experiment eine Beteiligung des AhR an den antileukämischen Effekten in HL-60 Zellen gezeigt werden. Dies kann an der nicht ausreichenden Blockierung des AhR durch die Antagonisten liegen, denn es ist nicht auszuschließen, dass für die Vermittlung der untersuchten Effekte ein zu 30 % funktioneller AhR Signalweg ausreicht. Diese Vermutung könnte nur mit einer erfolgreichen vollständigen Eliminierung (knock-out/down Zelllinie) bestätigt werden. Es ist jedoch wahrscheinlicher,

dass Indirubin-3'-oxim über AhR unabhängige Signalwege antileukämisch wirkt, da mit den verwendeten Antagonisten eine deutliche Hemmung des AhR Signalweges gezeigt werden konnte, jedoch keinerlei Tendenzen einer Veränderung der durch Indirubin-3'-oxim hervorgerufenen antileukämischen Effekte nach AhR Inhibierung detektierbar war. Für Indirubin-3'-oxim sind andere Signalwege beschrieben, die diese Effekte exklusiv oder synergistisch erzielen können. Die am häufigsten beschriebene Wirkung von Indirubin-3'-oxim ist die Inhibition der Zyklinabhängigen Kinasen (CDK), die eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Zellzyklus spielen. Die Inhibition der CDK führt zu Zellzyklusarrest und der Einleitung der Apoptose in verschiedenen humanen Tumorzellen. Hierbei werden sowohl die Caspasen 8, 9 und 3 als auch die Proteine der bcl-2 Familie reguliert (Hoessel, 1999; Shi, 2008). Die Inhibition der CDK stellt eine Möglichkeit der Apoptoseinduktion durch Indirubin-3'-oxim dar, eine weitere ist die Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Dies geschieht durch die Blockierung der Phosphorylierung und somit der Blockierung der Degradation von I κ B α , einem Faktor, der Untereinheiten von NF- κ B bindet und so inaktiviert (Sethi, 2006). NF- κ B reguliert eine Reihe antiapoptotischer Proteine wie Survivin, IAP1, IAP2, Bcl-2, Bcl-xL und TRAF1 und Proteine die in den Zellzyklus involviert sind, wie cyclin D1 und Myc (Kumar, 2004). Die Hemmung von NF- κ B führt zu einer Hemmung der Proliferation und zur Induktion der Apoptose durch ein Übergewicht an proapoptotischen Faktoren (Aggarwal, 2004). In den gezeigten Versuchen konnte in HL-60 Zellen mit Indirubin-3'-oxim sowohl eine indirekte Hemmung des Zellzyklus durch die Induktion der CDK Inhibitoren p21 und p27, als auch eine Verschiebung der Expression der Proteine der bcl-2 Familie bcl-2 und bax zum proapoptotischen bax bewirkt werden. Die Rolle als Ligand des AhR hatte bei diesen Effekten in HL-60 Zellen keinen Einfluss, auch wenn p21, p27 und bax in anderen Zellsystemen als Zielgene des AhR beschrieben wurden (Matikainen, 2001; Pang, 2008).

Nach Vorbehandlung mit AhR Antagonisten zeigte sich keine Änderung der Viabilität nach Behandlung mit Curcumin. Auch die Curcumin bedingte Expression der Gene des Zellzyklus p21 und p27 sowie der Apoptosegene bcl-2, bcl-xl, bad und bax wurde durch die Blockierung des AhR nicht verändert. Die spezifische Induktion des extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweges gemessen an der Aktivität der Caspasen 8 und 9 durch Curcumin geschah ebenfalls nicht über den AhR. Anders verhielt es sich bei der Aktivität der Caspasen 3 und 7. Die Blockierung des AhR durch den spezifischen Antagonisten MNF führte zu einer um 21 % verminderten Aktivität dieser Effektorcaspasen. Die Aktivität der Effektorcaspasen 3, 6 und 7

repräsentiert nahezu die Gesamtheit aller Apoptosesignale des extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweges sowie anderer Apoptose regulierender Faktoren wie Xiap oder Smac (Salvesen, 2002). Es gibt jedoch auch am Ende der Caspasekaskade noch Faktoren, die einen Einfluss auf die Apoptoseinduktion haben. Die Inhibitoren der Apoptose (IAP) können die Effektorcaspasen hemmen und so an dieser Stelle die Apoptoseinduktion beeinflussen. Eines der IAP, das Survivin wird durch das AhR interagierende Protein (AIP) stabilisiert (Kang, 2006), welches zusammen mit Hsp90 und p23 den AhR Chaperon Komplex bildet (Abb. 3). Wird der AhR aktiviert, so dissoziiert dieser Komplex und die Chaperone werden freigesetzt. Dieser Einfluss auf AIP könnte sich auch auf die Stabilisierung des Survivin auswirken und so proapoptotisch wirken, bzw. das frei gewordene AIP könnte mehr Survivin stabilisieren und so antiapoptotisch wirken. Diese Hypothesen bieten einen Ansatz, warum nach Blockierung des AhR lediglich eine Wirkung auf die Effektorcaspasen, nicht jedoch auf die vorgeschalteten Initiatorcaspasen zu beobachten war. Die 21 %ige Abhängigkeit der Caspase 3/7 Aktivierung vom AhR reichte jedoch nicht aus, um einen Einfluss auf die Viabilität der HL-60 Leukämiezelllinie zu haben. Dass die Reduktion der Aktivitäten der Effektorcaspasen 3/7 keinen Einfluss auf die Viabilität hatte ist zum einen durch die nicht vermessene Effektorcaspase 6 zu erklären, deren Aktivität die anderen Effekte überlagern kann. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die verbleibende Caspaseaktivität bereits einen gewissen Schwellenwert überschritten hatte, somit eine „Alles oder nichts Antwort“ ablief und der Effekt auf die Viabilität der gleiche blieb (West, 2006). Weiterhin kann Curcumin auch über andere Signalwege proapoptotisch wirken, die unabhängig vom AhR sind. Curcumin kann Survivin direkt inhibieren, was in HAT-29 (Dickdarmkrebs) Zellen bereits gezeigt wurde (Wang, 2009). NF- κ B wird wie durch Indirubin-3'-oxim durch Curcumin ebenfalls gehemmt und somit die Expression seiner antiapoptotischen und proliferationsfördenden Zielgene blockiert (Aggarwal, 2004). Curcumin hat auch Einfluss auf den Erk-Signalweg, MAP-Kinasen und Protein Kinase C (PKC), die wiederum bei der Regulierung der Apoptose beteiligt sind (Johnson, 2007). Des Weiteren hat Curcumin Einfluss auf den ROS-Gehalt der Zelle. Curcumin hat antioxidative Eigenschaften z.B. in Mononukleären Zellen (Chan, 2006), kann jedoch auch ROS induzieren wie z.B. in humanen Kolon Karzinom Zellen oder Hepatozyten (McNally, 2007; Su, 2006). Dies kann sowohl direkte regulatorische, als auch indirekte Effekte durch Zellschädigung bewirken (s.o.).

Die Tatsache, dass alle drei gewählten Substanzen den AhR aktivierten, jedoch unterschiedliche Effekte und eine unterschiedliche Abhängigkeit dieser Effekte vom AhR

zeigten, ist auch mit der Funktion bzw. der Beschaffenheit des AhR selbst zu erklären. Es ist bis heute nicht geklärt, in wie fern und wie verschiedene Substanzen den AhR unterschiedlich aktivieren. Der hoch affine AhR Ligand TCDD induziert z.B. ein anderes Expressionsprofil als Indirubin, ein AhR Ligand mit ähnlicher Affinität zum AhR (Adachi, 2004). Die Affinität zum AhR ist ein Faktor, der für die Art und die Intensität der Regulation über den AhR von Bedeutung ist (Kronenberg, 2000). 10 μ M Indirubin-3'-oxim induzieren wie in dieser Arbeit gezeigt z.B. mehr Cyp1a1 als 100 μ M Quercetin, jedoch weniger als 50 μ M Curcumin. Eine höhere Affinität zur Bindungsstelle des AhR führt zu stärkerer Bindung und stärkerer Induktion der Zielgene des AhR (Backlund, 2004). Hierdurch werden auch andere Signalwege mehr oder weniger stark von den AhR Liganden reguliert, abhängig davon wie viel der AhR bei einer möglichen kompetitiven Bindung von den Liganden bindet und so anderen Signalwegen entzieht. Dabei ist auch der Stoffwechsel der Substanzen von Bedeutung und die effektive Menge der Liganden, die den AhR in der Zelle aktivieren kann (Harper, 2006). Curcumin z.B. wird je nach Enzymausstattung der Zelle unterschiedlich stark verstoffwechselt, hauptsächlich glucuronidiert und verliert damit seine AhR Ligandenaktivität (Anand, 2007). Für den Metabolismus von Quercetin ist beschrieben, dass er neben der Zellspezifität auch vom Status der Zelle abhängig ist. In apoptotischen Zellen wird Quercetin z. B. langsamer verstoffwechselt (Methyliert oder Glycosyliert) als in vitalen Zellen (Gutzeit, 2004). Somit bestimmen Zelltyp und Zellstatus die Bioverfügbarkeit der AhR Liganden.

Die Microarrayanalyse ergab, dass Curcumin verstärkt Gene des Metabolismus, der Biosynthese und des Katabolismus, sowie Koenzyme und Kofaktoren regulierte. Durch die Literatur ist bekannt, dass Curcumin je nach Enzymausstattung der Zelle stark verstoffwechselt wird und somit Stoffwechselwege und Faktoren wie z.B. die Sulfatasen, Oxidoreduktasen oder Glucoronidasen aktiviert werden (Ireson, 2002a; Singh, 2006). Apoptose wird durch Curcumin zwar auch induziert, jedoch war die Regulierung der betroffenen Gene in dem durchgeführten Microarrayexperiment nicht signifikant überrepräsentiert. Dies bedeutet, dass Curcumin aufgrund der Chipdaten in HL-60 Zellen zwar viele Stoffwechselwege beeinflusst, die Apoptose jedoch nur durch die Regulierung weniger Gene induziert wird. Die in der Arbeit durch RT-PCR untersuchten Gene wie p21, p27, bcl-2 und bax waren auch auf dem Chip reguliert (bcl-2), auf dem Chip nicht vertreten (p21, p27) oder nicht signifikant reguliert (bax). Da die Sensitivität einer PCR höher ist als die der Hybridisierung der biotinylierten RNA auf einem Chip sind in diesem Fall die Ergebnisse der PCR jedoch als Aussagekräftiger anzusehen.

3. Welche anderen Signalwege sind an der antileukämischen Wirkung von Curcumin beteiligt?

Die Microarraytechnologie ist zwar weniger sensitiv als die PCR und kann somit zum Verlust einzelner Informationen gegenüber der PCR führen, gibt jedoch durch die Analyse von über 22000 Genen gleichzeitig einen guten Überblick über die Veränderungen in der Zelle nach der Behandlung mit Curcumin. Diese große Zahl an untersuchten Genen half dabei die Expression in HL-60 Zellen nach Behandlung mit Curcumin mit der Expression von HL-60 Zellen nach anderen Behandlungen zu vergleichen. Die Behandlung mit anderen Substanzen, von denen bekannt ist welche Signalwege sie regulieren wie z.B. 1,25 Dihydroxyvitamin D3 (VD3) oder 16-Ketoestradiol sollte im Vergleich zeigen, welche dieser Signalwege auch von Curcumin beeinflusst werden. Die Darstellung der eigenen Ergebnisse im Vergleich zu anderen im Internet verfügbaren Expressionsprofilen in einer Heatmap zeigte durch sogenanntes „Clustering“, eine große Übereinstimmung der Behandlung von HL-60 Zellen mit VD3 und Curcumin. So waren 27 % der von Curcumin regulierten Gene im gleichen Maße von VD3 reguliert. Bei den über 22000 untersuchten Genen auf dem Chip war dies eine äußerst große Übereinstimmung zwischen zwei unabhängigen Behandlungen mit verschiedenen Substanzen, was auch durch das sehr ähnliche Farbmuster in der Heatmap zu ersehen war. Die Ähnlichkeit im Expressionsprofil mit dem hoch affinen AhR Liganden TCDD war geringer als mit VD3. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die AhR-Ligandenaktivität von Curcumin in HL-60 Zellen nicht der Hauptgrund für sein Wirkungsspektrum ist. Die VDR-Ligandenaktivität war in diesem Fall, wenn man von der Quantität und nicht der Qualität der regulierten Gene ausgeht, höher. VD3 ist der bekannteste Ligand für den Vitamin D Rezeptor (VDR) und aktiviert ihn aufgrund seiner hohen Affinität (Cross, 2003). Dieses Resultat beweist, dass Curcumin den VDR in HL-60 Zellen ebenfalls zu einem hohen Maße aktiviert und einen Einfluss auf die Expression seiner Zielgene besitzt. Ob dies durch Curcumin direkt oder indirekt durch ein Stoffwechselprodukt von Curcumin oder einen durch Curcumin aktivierten anderen Signalweg geschieht ist aufgrund des Expressionsprofils und Literaturdaten (Ireson, 2002b) nicht eindeutig zu bestimmen.

Da in dieser Arbeit die Mechanismen der antileukämischen Eigenschaften von Curcumin untersucht wurden, war es von großem Interesse, dass die von Curcumin und VDR gemeinsam regulierten Gene die Caspase Aktivität und die Differenzierung beeinflussen. Die ursprüngliche Untersuchung des zum Vergleich herangezogenen Datensatzes GE995 sollte die Induktion der Differenzierung von HL-60 Zellen untersuchen (Stegmaier, 2004). Die

Differenzierung von Tumorzellen ist neben der Eliminierung durch Apoptoseinduktion eine weitere neuerdings verstärkt untersuchte Therapiemethode, die die entarteten meist funktionslosen Zellen in den Organismus „wiedereingliedern“ sollen um so den Tumor aufzulösen und die normale Funktion des betroffenen Gewebes wiederherzustellen (Sell, 2006). Neben der Induktion der Differenzierung ist Curcumin und VD3 auch die Induktion der Apoptose durch Regulation der Caspase Aktivität gemeinsam. Curcumin induzierte die Apoptose zu einem geringen Teil über den AhR und zu einem größeren Teil durch die Aktivierung des VDR. Da für Curcumin auch ein Einfluss auf andere Apoptose regulierende Signalwege wie z.B. NF- κ B, Stat3, Akt, JNK oder MAPK beschrieben ist (Aggarwal, 2006), ist davon auszugehen, dass die Wirkung von Curcumin sich im Falle der Apoptoseinduktion nicht auf einen einzigen bzw. diese zwei Signalwege beschränkt, sondern durch ein Zusammenwirken mehrerer gleichzeitig aktivierter Wege zustande kommt. Für die therapeutische Anwendung von Curcumin bedeutet dies, dass zwar eine antileukämische Wirkung von Curcumin besteht und diese genutzt werden kann, jedoch erst die vollständige Aufklärung aller beteiligten Signalwege eine sichere und prognostizierbare Anwendung ermöglichen wird.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse tragen wesentlich zum weiteren Verständnis der antileukämischen Wirkung von Naturstoffen und insbesondere von Curcumin bei und zeigen zusätzlich neue Ansatzpunkte für künftige Untersuchungen auf. Zukünftige Experimente sollten zur Aufklärung der Beteiligung des AhR ein System wählen, das die vollständige Blockierung des AhR erlaubt, wie knock-out oder knock-down Organismen bzw. Zelllinien. Die hier erzielten Hinweise auf andere Signalwege können ebenfalls in Zukunft genutzt werden, um durch gezielte Blockierung ihre Beteiligung an der Wirkung der untersuchten Substanzen zu ermitteln. Hierbei könnte nachhaltig geklärt werden, ob exklusive Mechanismen existieren, oder die Synergie mehrerer Effekte zur antileukämischen Wirkung führt.

V. Zusammenfassung:

Die Heterogenität der Leukämieerkrankungen macht es zum jetzigen Stand der Wissenschaft schwer jede Erkrankung gezielt zu bearbeiten. Um die Behandlungen individuell optimieren zu können müssen die exakten Wirkmechanismen antileukämischer Substanzen aufgeklärt werden. Curcumin und Quercetin aus der Gruppe der Flavonoide und Indirubin-3'-oxim aus der Gruppe der Indole zeigen antileukämische Wirkungen und sind gleichzeitig Liganden des AhR. Der AhR ist ein Liganden aktivierter Transkriptionsfaktor, der als Sensor für externe aber auch interne Liganden fungiert und sowohl ihren Metabolismus induziert, als auch Prozesse wie den Zellzyklus und die Apoptose reguliert.

Diese Arbeit sollte zeigen, ob die antileukämische Wirkung der natürlichen AhR Liganden Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin in der Leukämiezelllinie HL-60 über den AhR vermittelt wird (Abb. 37). Die Beteiligung des AhR an der antileukämischen Wirkung von Curcumin ist vorhanden. Die Effektorcaspasen 3 und 7 werden durch Curcumin in HL-60 Zellen AhR abhängig induziert, jedoch wird diese Aktivierung nicht exklusiv durch den AhR vermittelt. Indirubin-3'-oxim und Quercetin zeigen zwar eine antileukämische Wirkung in HL-60 Zellen, jedoch ist diese AhR unabhängig. Die Gene, die in anderen Zellsystemen als Zielgene des AhR beschrieben wurden wie p21, p27 und bax werden in HL-60 Zellen durch die drei Substanzen AhR unabhängig induziert. Die hier gezeigten Ergebnisse verstärken die Annahme, dass die Wirkung des AhR sowohl Liganden-, als auch Zelltypabhängig ist, da bestimmte DREs in diesem Zellsystem nicht funktionell sind.

Zusammengefasst ist der AhR an der antileukämischen Wirkung natürlicher Substanzen beteiligt, jedoch wird diese Wirkung durch die Synergie mehrerer Signalwege vermittelt.

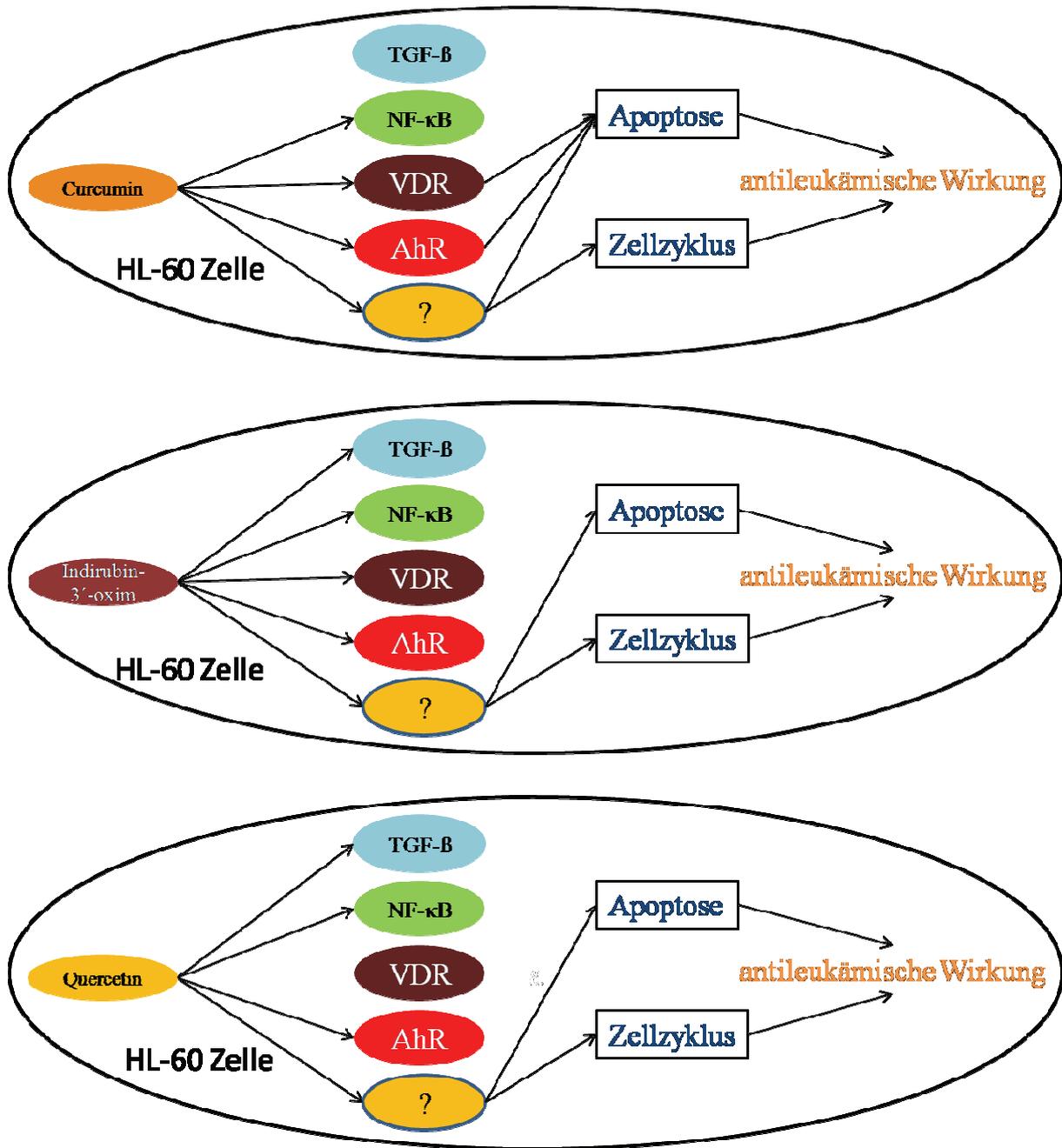


Abb. 37: Schematische Darstellung der Ergebnisse. Nur Curcumin wirkt über den AhR antileukämisch, jedoch entsteht der antileukämische Effekt durch ein Zusammenspiel mit verschiedenen Signalwegen wie dem VDR. Curcumin, Indirubin-3'-oxim und Quercetin aktivieren in HL-60 Zellen auch andere Gene, die die Induktion der Apoptose und die Regulierung des Zellzyklus steuern. Das Fragezeichen steht für die in dieser Arbeit nicht untersuchten Signalwege, die potenziell an der antileukämischen Wirkung in HL-60 Zellen beteiligt sind.

VI. Literaturverzeichnis

1. 1979) [Clinical and experimental studies in the treatment of chronic granulocytic leukemia with indirubin (author's transl)]. *Zhonghua Nei Ke.Za Zhi.* 18: 83-88.
2. Adachi, J., Mori, Y., Matsui, S., and Matsuda, T. (2004) Comparison of gene expression patterns between 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and a natural arylhydrocarbon receptor ligand, indirubin. *Toxicol.Sci.* 80: 161-169.
3. Adachi, J., Mori, Y., Matsui, S., Takigami, H., Fujino, J., Kitagawa, H., Miller, C.A., III, Kato, T., Saeki, K., and Matsuda, T. (2001) Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J.Biol.Chem.* 276: 31475-31478.
4. Aggarwal, B.B. and Shishodia, S. (2004) Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1030: 434-441.
5. Aggarwal, B.B. and Shishodia, S. (2006) Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem.Pharmacol.* 71: 1397-1421.
6. Aggarwal, B.B., Shishodia, S., Takada, Y., Banerjee, S., Newman, R.A., Bueso-Ramos, C.E., and Price, J.E. (2005) Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice. *Clin.Cancer Res.* 11: 7490-7498.
7. Ahsan, H., Parveen, N., Khan, N.U., and Hadi, S.M. (1999) Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Chem.Biol.Interact.* 121: 161-175.
8. Alvero, A.B., Kelly, M., Rossi, P., Leiser, A., Brown, D., Rutherford, T., and Mor, G. (2008) Anti-tumor activity of phenoxodiol: from bench to clinic. *Future.Oncol.* 4: 475-482.
9. Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Newman, R.A., and Aggarwal, B.B. (2007) Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol.Pharm.* 4: 807-818.
10. Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B., and Aggarwal, B.B. (2008a) Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm.Res.* 25: 2097-2116.
11. Anand, P., Sundaram, C., Jhurani, S., Kunnumakkara, A.B., and Aggarwal, B.B. (2008b) Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. *Cancer Lett.* 267: 133-164.

12. Anto, R.J., George, J., Babu, K.V., Rajasekharan, K.N., and Kuttan, R. (1996) Antimutagenic and anticarcinogenic activity of natural and synthetic curcuminoids. *Mutat.Res.* 370: 127-131.
13. Aoi, W., Naito, Y., and Yoshikawa, T. (2006) Exercise and functional foods. *Nutr.J.* 5: 15-
14. Appelbaum, F.R., Rowe, J.M., Radich, J., and Dick, J.E. (2001) Acute myeloid leukemia. *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* 62-86.
15. Backlund, M. and Ingelman-Sundberg, M. (2004) Different structural requirements of the ligand binding domain of the aryl hydrocarbon receptor for high- and low-affinity ligand binding and receptor activation. *Mol.Pharmacol.* 65: 416-425.
16. Banaszynski, L.A., Chen, L.C., Maynard-Smith, L.A., Ooi, A.G., and Wandless, T.J. (2006) A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. *Cell.* 126: 995-1004.
17. Bar-Nun, S., Shneyour, Y., and Beckmann, J.S. (1983) G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. *Biochim.Biophys.Acta.* 741: 123-127.
18. Barouki, R., Coumoul, X., and Fernandez-Salguero, P.M. (2007) The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett.* 581: 3608-3615.
19. Beischlag, T.V., Luis, M.J., Hollingshead, B.D., and Perdew, G.H. (2008) The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* 18: 207-250.
20. Belka, C., Jendrossek, V., Pruschy, M., Vink, S., Verheij, M., and Budach, W. (2004) Apoptosis-modulating agents in combination with radiotherapy-current status and outlook. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 58: 542-554.
21. Brauze, D., Widerak, M., Cwykiel, J., Szyfter, K., and Baer-Dubowska, W. (2006) The effect of aryl hydrocarbon receptor ligands on the expression of AhR, AhRR, ARNT, Hif1alpha, CYP1A1 and NQO1 genes in rat liver. *Toxicol.Lett.* 167: 212-220.
22. Burhans, W.C., Weinberger, M., Marchetti, M.A., Ramachandran, L., D'Urso, G., and Huberman, J.A. (2003) Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects. *Mutat.Res.* 532: 227-243.
23. Burmeister, T. and Thiel, E. (2001) Molecular genetics in acute and chronic leukemias. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 127: 80-90.
24. Bursch, W., Ellinger, A., Gerner, C., Frohwein, U., and Schulte-Hermann, R. (2000) Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 926: 1-12.
25. Carlson, D.B. and Perdew, G.H. (2002) A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. *J.Biochem.Mol.Toxicol.* 16: 317-325.

26. Chan, W.H. and Wu, H.J. (2006) Protective effects of curcumin on methylglyoxal-induced oxidative DNA damage and cell injury in human mononuclear cells. *Acta Pharmacol.Sin.* 27: 1192-1198.
27. Chang, H., Mi, M.T., Gu, Y.Y., Yuan, J.L., Ling, W.H., and Lin, H. (2007) [Effects of flavonoids with different structures on proliferation of leukemia cell line HL-60]. *Ai.Zheng.* 26: 1309-1314.
28. Choudhuri, T., Pal, S., Das, T., and Sa, G. (2005) Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 phase of cell cycle in a p53-dependent manner. *J.Biol.Chem.* 280: 20059-20068.
29. Christie, R.M. (2007) Why is indigo blue? *Biotech.Histochem.* 82: 51-56.
30. Cilloni, D., Martinelli, G., Messa, F., Baccarani, M., and Saglio, G. (2007) Nuclear factor kB as a target for new drug development in myeloid malignancies. *Haematologica.* 92: 1224-1229.
31. Ciolino, H.P., Daschner, P.J., Wang, T.T., and Yeh, G.C. (1998) Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochem.Pharmacol.* 56: 197-206.
32. Ciolino, H.P., Daschner, P.J., and Yeh, G.C. (1999) Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem.J.* 340 (Pt 3): 715-722.
33. Clerkin, J.S., Naughton, R., Quiney, C., and Cotter, T.G. (2008) Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogenesis. *Cancer Lett.* 266: 30-36.
34. Cohen, J.J. (1996) Apoptosis and its regulation. *Adv.Exp.Med.Biol.* 406: 11-20.
35. Collins, S.J. (1987) The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood.* 70: 1233-1244.
36. Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E., and Gallo, R.C. (1978) Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 75: 2458-2462.
37. Cowan, M.M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin.Microbiol.Rev.* 12: 564-582.
38. Cross, H.S., Kallay, E., Khorchide, M., and Lechner, D. (2003) Regulation of extrarenal synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D3--relevance for colonic cancer prevention and therapy. *Mol.Aspects Med.* 24: 459-465.
39. Dalton, W.T., Jr., Ahearn, M.J., McCredie, K.B., Freireich, E.J., Stass, S.A., and Trujillo, J.M. (1988) HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood.* 71: 242-247.
40. Danial, N.N. (2007) BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin.Cancer Res.* 13: 7254-7263.

41. Davies, K.J. (1999) The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB.Life*. 48: 41-47.
42. Deml, E., Mangelsdorf, I., and Greim, H. (1996) Chlorinated dibenzodioxins and dibenzofurans (PCDD/F) in blood and human milk of non occupationally exposed persons living in the vicinity of a municipal waste incinerator. *Chemosphere*. 33: 1941-1950.
43. Denison, M.S. and Nagy, S.R. (2003) Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol*. 43: 309-334.
44. Denison, M.S., Pandini, A., Nagy, S.R., Baldwin, E.P., and Bonati, L. (2002) Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem.Biol.Interact*. 141: 3-24.
45. Dhillon, N., Aggarwal, B.B., Newman, R.A., Wolff, R.A., Kunnumakkara, A.B., Abbruzzese, J.L., Ng, C.S., Badmaev, V., and Kurzrock, R. (2008) Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. *Clin.Cancer Res*. 14: 4491-4499.
46. Dorta, D.J., Pigoso, A.A., Mingatto, F.E., Rodrigues, T., Pestana, C.R., Uyemura, S.A., Santos, A.C., and Curti, C. (2008) Antioxidant activity of flavonoids in isolated mitochondria. *Phytother.Res*. 22: 1213-1218.
47. Drexler, H.G. (1998) Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia*. 12: 845-859.
48. Elferink, C.J. (2003) Aryl hydrocarbon receptor-mediated cell cycle control. *Prog.Cell Cycle Res*. 5: 261-267.
49. Erlund, I., Freese, R., Marniemi, J., Hakala, P., and Alfthan, G. (2006) Bioavailability of quercetin from berries and the diet. *Nutr.Cancer*. 54: 13-17.
50. Fadeel, B. and Orrenius, S. (2005) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J.Intern.Med*. 258: 479-517.
51. Fiedler, H. (1996) Sources of PCDD/PCDF and impact on the environment. *Chemosphere*. 32: 55-64.
52. Finn, R. (2000) Oncologist's role critical to clinical trial enrollment. *J.Natl.Cancer Inst*. 92: 1632-1634.
53. Formica, J.V. and Regelson, W. (1995) Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem.Toxicol*. 33: 1061-1080.
54. Frericks, M., Burgoon, L.D., Zacharewski, T.R., and Esser, C. (2008) Promoter analysis of TCDD-inducible genes in a thymic epithelial cell line indicates the potential for cell-specific transcription factor crosstalk in the AhR response. *Toxicol.Appl.Pharmacol*. 232: 268-279.
55. Gaedeke, J., Noble, N.A., and Border, W.A. (2004) Curcumin blocks multiple sites of the TGF-beta signaling cascade in renal cells. *Kidney Int*. 66: 112-120.

56. Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., and Gallo, R. (1979) Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 54: 713-733.
57. Gerhauser, C., Klimo, K., Heiss, E., Neumann, I., Gamal-Eldeen, A., Knauft, J., Liu, G.Y., Sitthimonchai, S., and Frank, N. (2003) Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutat.Res.* 523-524: 163-172.
58. Granado-Serrano, A.B., Martin, M.A., Bravo, L., Goya, L., and Ramos, S. (2006a) Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J.Nutr.* 136: 2715-2721.
59. Granado-Serrano, A.B., Martin, M.A., Bravo, L., Goya, L., and Ramos, S. (2006b) Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J.Nutr.* 136: 2715-2721.
60. Grande, A., Manfredini, R., Tagliafico, E., Balestri, R., Pizzanelli, M., Papa, S., Zucchini, P., Bonsi, L., Bagnara, G., Torelli, U., and . (1995) All-trans-retinoic acid induces simultaneously granulocytic differentiation and expression of inflammatory cytokines in HL-60 cells. *Exp.Hematol.* 23: 117-125.
61. Gu, Y.Z., Hogenesch, J.B., and Bradfield, C.A. (2000) The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 40: 519-561.
62. Guignet, E.G. and Meyer, T. (2008) Suspended-drop electroporation for high-throughput delivery of biomolecules into cells. *Nat.Methods.* 5: 393-395.
63. Gupte, S.A. (2008) Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a novel therapeutic target in cardiovascular diseases. *Curr.Opin.Investig.Drugs.* 9: 993-1000.
64. Gutzeit, H.O., Henker, Y., Kind, B., and Franz, A. (2004) Specific interactions of quercetin and other flavonoids with target proteins are revealed by elicited fluorescence. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 318: 490-495.
65. Hale, A.J., Smith, C.A., Sutherland, L.C., Stoneman, V.E., Longthorne, V.L., Culhane, A.C., and Williams, G.T. (1996) Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur.J.Biochem.* 236: 1-26.
66. Harper, P.A., Riddick, D.S., and Okey, A.B. (2006) Regulating the regulator: factors that control levels and activity of the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem.Pharmacol.* 72: 267-279.
67. Harper, P.A., Wong, J.Y., Lam, M.S., and Okey, A.B. (2002) Polymorphisms in the human AH receptor. *Chem.Biol.Interact.* 141: 161-187.

68. Harris, M.H. and Thompson, C.B. (2000) The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death.Differ.* 7: 1182-1191.
69. Haussler, M.R., Haussler, C.A., Bartik, L., Whitfield, G.K., Hsieh, J.C., Slater, S., and Jurutka, P.W. (2008) Vitamin D receptor: molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention. *Nutr.Rev.* 66: S98-112.
70. He, B.L., Sun, E.J., and Yang, D. (2006) [Preparation of new lipid-hydroxyapatite-DNA complex and gene transfection reseach in eukaryotic cell]. *Sheng Wu Gong.Cheng Xue.Bao.* 22: 795-799.
71. Henry, E.C., Kende, A.S., Rucci, G., Totleben, M.J., Willey, J.J., Dertinger, S.D., Pollenz, R.S., Jones, J.P., and Gasiewicz, T.A. (1999) Flavone antagonists bind competitively with 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) to the aryl hydrocarbon receptor but inhibit nuclear uptake and transformation. *Mol.Pharmacol.* 55: 716-725.
72. Hertog, M.G. and Hollman, P.C. (1996) Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Eur.J.Clin.Nutr.* 50: 63-71.
73. Hertog, M.G., Hollman, P.C., Katan, M.B., and Kromhout, D. (1993) Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr.Cancer.* 20: 21-29.
74. Hirahara, T. (2004) Key factors for the success of functional foods. *Biofactors.* 22: 289-294.
75. Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J.A., Nobel, M.E., Lawrie, A., Tunnah, P., Leost, M., Damiens, E., Marie, D., Marko, D., Niederberger, E., Tang, W., Eisenbrand, G., and Meijer, L. (1999) Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat.Cell Biol.* 1: 60-67.
76. Hofmann, K. (1999) The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell Mol.Life Sci.* 55: 1113-1128.
77. Hotchkiss, R.S. and Nicholson, D.W. (2006) Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat.Rev.Immunol.* 6: 813-822.
78. Hsu, B. (1980) The use of herbs as anticancer agents. *Am.J.Chin Med.* 8: 301-306.
79. Hsu, C.H. and Cheng, A.L. (2007) Clinical studies with curcumin. *Adv.Exp.Med.Biol.* 595: 471-480.
80. Ireson, C.R., Jones, D.J., Orr, S., Coughtrie, M.W., Boocock, D.J., Williams, M.L., Farmer, P.B., Steward, W.P., and Gescher, A.J. (2002b) Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 11: 105-111.
81. Ireson, C.R., Jones, D.J., Orr, S., Coughtrie, M.W., Boocock, D.J., Williams, M.L., Farmer, P.B., Steward, W.P., and Gescher, A.J. (2002a) Metabolism of the

- cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 11: 105-111.
82. James, S.Y., Williams, M.A., Newland, A.C., and Colston, K.W. (1999) Leukemia cell differentiation: cellular and molecular interactions of retinoids and vitamin D. *Gen.Pharmacol.* 32: 143-154.
 83. Johansson, M. and Persson, J.L. (2008) Cancer therapy: targeting cell cycle regulators. *Anticancer Agents Med.Chem.* 8: 723-731.
 84. Johnson, D.G., Schwarz, J.K., Cress, W.D., and Nevins, J.R. (1993) Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature.* 365: 349-352.
 85. Johnson, J.J. and Mukhtar, H. (2007) Curcumin for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Lett.* 255: 170-181.
 86. Kalmes, M., Neumeyer, A., Rio, P., Hanenberg, H., Fritsche, E., and Blomeke, B. (2006) Impact of the arylhydrocarbon receptor on eugenol- and isoeugenol-induced cell cycle arrest in human immortalized keratinocytes (HaCaT). *Biol.Chem.* 387: 1201-1207.
 87. Kang, B.H. and Altieri, D.C. (2006) Regulation of survivin stability by the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein. *J.Biol.Chem.* 281: 24721-24727.
 88. Kanli, A. and Savli, H. (2007) Differential expression of 16 genes coding for cell cycle- and apoptosis-related proteins in vitamin D-induced differentiation of HL-60 cells. *Exp.Oncol.* 29: 314-316.
 89. Karmakar, S., Banik, N.L., Patel, S.J., and Ray, S.K. (2006) Curcumin activated both receptor-mediated and mitochondria-mediated proteolytic pathways for apoptosis in human glioblastoma T98G cells. *Neurosci.Lett.* 407: 53-58.
 90. Karunagaran, D., Rashmi, R., and Kumar, T.R. (2005) Induction of apoptosis by curcumin and its implications for cancer therapy. *Curr.Cancer Drug Targets.* 5: 117-129.
 91. Kim, H.S., Loughran, P.A., Rao, J., Billiar, T.R., and Zuckerbraun, B.S. (2008) Carbon monoxide activates NF-kappaB via ROS generation and Akt pathways to protect against cell death of hepatocytes. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol.* 295: G146-G152.
 92. Knutson, J.C. and Poland, A. (1982) Response of murine epidermis to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: interaction of the ah and hr loci. *Cell.* 30: 225-234.
 93. Kondraganti, S.R., Muthiah, K., Jiang, W., Barrios, R., and Moorthy, B. (2005) Effects of 3-methylcholanthrene on gene expression profiling in the rat using cDNA microarray analyses. *Chem.Res.Toxicol.* 18: 1634-1641.

94. Kronenberg, S., Esser, C., and Carlberg, C. (2000) An aryl hydrocarbon receptor conformation acts as the functional core of nuclear dioxin signaling. *Nucleic Acids Res.* 28: 2286-2291.
95. Kuhar, M., Sen, S., and Singh, N. (2006) Role of mitochondria in quercetin-enhanced chemotherapeutic response in human non-small cell lung carcinoma H-520 cells. *Anticancer Res.* 26: 1297-1303.
96. Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A.M., and Aggarwal, B.B. (2004) Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J.Mol.Med.* 82: 434-448.
97. Kyaw, M., Yoshizumi, M., Tsuchiya, K., Izawa, Y., Kanematsu, Y., and Tamaki, T. (2004) Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases. *Acta Pharmacol.Sin.* 25: 977-985.
98. la-Favera, R., Westin, E., Gelmann, E.P., Martinotti, S., Bregni, M., Wong-Staal, F., and Gallo, R.C. (1983) The human onc gene c-myc: structure, expression, and amplification in the human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Haematol.Blood Transfus.* 28: 247-254.
99. Le Beau, M.M., Diaz, M.O., Karin, M., and Rowley, J.D. (1985) Metallothionein gene cluster is split by chromosome 16 rearrangements in myelomonocytic leukaemia. *Nature.* 313: 709-711.
100. Lee, J.C., Kim, J., Park, J.K., Chung, G.H., and Jang, Y.S. (2003) The antioxidant, rather than prooxidant, activities of quercetin on normal cells: quercetin protects mouse thymocytes from glucose oxidase-mediated apoptosis. *Exp.Cell Res.* 291: 386-397.
101. Li, Q., Ozer, H., Lindner, I., Lee, K.P., and Kharfan-Dabaja, M.A. (2005) Protein kinase C blockade inhibits differentiation of myeloid blasts into dendritic cells by calcium ionophore A23187. *Int.J.Hematol.* 81: 131-137.
102. Ma, Q. (2002) Induction and superinduction of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-rho-dioxin-inducible poly(ADP-ribose) polymerase: role of the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator transcription activation domains and a labile transcription repressor. *Arch.Biochem.Biophys.* 404: 309-316.
103. Ma, Q. and Baldwin, K.T. (2000) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway. Role of the transcription activator and DNA binding of AhR. *J.Biol.Chem.* 275: 8432-8438.
104. Marnett, L.J. (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 21: 361-370.
105. Martin, D., Brun, C., Remy, E., Mouren, P., Thieffry, D., and Jacq, B. (2004) GOToolBox: functional analysis of gene datasets based on Gene Ontology. *Genome Biol.* 5: R101-
106. Matikainen, T., Perez, G.I., Jurisicova, A., Pru, J.K., Schlezinger, J.J., Ryu, H.Y., Laine, J., Sakai, T., Korsmeyer, S.J., Casper, R.F., Sherr, D.H., and Tilly, J.L.

- (2001) Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat.Genet.* 28: 355-360.
107. McNally, S.J., Harrison, E.M., Ross, J.A., Garden, O.J., and Wigmore, S.J. (2007) Curcumin induces heme oxygenase 1 through generation of reactive oxygen species, p38 activation and phosphatase inhibition. *Int.J.Mol.Med.* 19: 165-172.
108. Montserrat, E. and Moreno, C. (2008) Chronic lymphocytic leukaemia: a short overview. *Ann.Oncol.* 19 Suppl 7: vii320-vii325.
109. Moon, Y.J., Wang, X., and Morris, M.E. (2006) Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol.In Vitro.* 20: 187-210.
110. Mu, C., Jia, P., Yan, Z., Liu, X., Li, X., and Liu, H. (2007) Quercetin induces cell cycle G1 arrest through elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human hepatoma cell line (HepG2). *Methods Find.Exp.Clin.Pharmacol.* 29: 179-183.
111. Murakami, A., Ashida, H., and Terao, J. (2008) Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett.* 269: 315-325.
112. Naka, K., Muraguchi, T., Hoshii, T., and Hirao, A. (2008) Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. *Antioxid.Redox.Signal.* 10: 1883-1894.
113. Nam, S., Buettner, R., Turkson, J., Kim, D., Cheng, J.Q., Muehlbeyer, S., Hippe, F., Vatter, S., Merz, K.H., Eisenbrand, G., and Jove, R. (2005) Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102: 5998-6003.
114. Nandakumar, V., Singh, T., and Katiyar, S.K. (2008) Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. *Cancer Lett.* 269: 378-387.
115. Nazarenko, D.A., Dertinger, S.D., and Gasiewicz, T.A. (2001) In vivo antagonism of AhR-mediated gene induction by 3'-methoxy-4'-nitroflavone in TCDD-responsive lacZ mice. *Toxicol.Sci.* 61: 256-264.
116. Nigg, E.A. (1995) Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays.* 17: 471-480.
117. Nishimura, M., Ueda, N., and Naito, S. (2003) Effects of dimethyl sulfoxide on the gene induction of cytochrome P450 isoforms, UGT-dependent glucuronosyl transferase isoforms, and ABCB1 in primary culture of human hepatocytes. *Biol.Pharm.Bull.* 26: 1052-1056.
118. Pae, H.O., Jeong, S.O., Jeong, G.S., Kim, K.M., Kim, H.S., Kim, S.A., Kim, Y.C., Kang, S.D., Kim, B.N., and Chung, H.T. (2007) Curcumin induces proapoptotic endoplasmic reticulum stress in human leukemia HL-60 cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 353: 1040-1045.

119. Pang, P.H., Lin, Y.H., Lee, Y.H., Hou, H.H., Hsu, S.P., and Juan, S.H. (2008) Molecular mechanisms of p21 and p27 induction by 3-methylcholanthrene, an aryl-hydrocarbon receptor agonist, involved in antiproliferation of human umbilical vascular endothelial cells. *J.Cell Physiol.* 215: 161-171.
120. Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J.Clin.* 55: 74-108.
121. Perdew, G.H. and Hollenback, C.E. (1995) Evidence for two functionally distinct forms of the human Ah receptor. *J.Biochem.Toxicol.* 10: 95-102.
122. Peter, G.F., Martin, M.V., McCormick, W.A., Nguyen, L.P., Glover, E., and Bradfield, C.A. (2004) Aryl hydrocarbon receptor response to indigoids in vitro and in vivo. *Arch.Biochem.Biophys.* 423: 309-316.
123. Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45-
124. Poland, A., Clover, E., Kende, A.S., DeCamp, M., and Giandomenico, C.M. (1976) 3,4,3',4'-Tetrachloro azoxybenzene and azobenzene: potent inducers of aryl hydrocarbon hydroxylase. *Science.* 194: 627-630.
125. Poland, A. and Glover, E. (1987) Variation in the molecular mass of the Ah receptor among vertebrate species and strains of rats. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 146: 1439-1449.
126. Puga, A., Tomlinson, C.R., and Xia, Y. (2005) Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways. *Biochem.Pharmacol.* 69: 199-207.
127. Puga, A., Xia, Y., and Elferink, C. (2002) Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Chem.Biol.Interact.* 141: 117-130.
128. Rannug, U., Rannug, A., Sjoberg, U., Li, H., Westerholm, R., and Bergman, J. (1995) Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands. *Chem.Biol.* 2: 841-845.
129. Rayalam, S., la-Fera, M.A., and Baile, C.A. (2008) Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *J.Nutr.Biochem.* 19: 717-726.
130. Russo, M., Palumbo, R., Mupo, A., Tosto, M., Iacomino, G., Scognamiglio, A., Tedesco, I., Galano, G., and Russo, G.L. (2003) Flavonoid quercetin sensitizes a CD95-resistant cell line to apoptosis by activating protein kinase Calpha. *Oncogene.* 22: 3330-3342.
131. Safe, S., Qin, C., and McDougal, A. (1999) Development of selective aryl hydrocarbon receptor modulators for treatment of breast cancer. *Expert.Opin.Investig.Drugs.* 8: 1385-1396.
132. Safe, S.H. (1995) Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem? *Environ.Health Perspect.* 103: 346-351.
133. Salvesen, G.S. (2002) Caspases and apoptosis. *Essays Biochem.* 38: 9-19.

-
134. Schlag, G., Redl, H., and Hallstrom, S. (1991) The cell in shock: the origin of multiple organ failure. *Resuscitation*. 21: 137-180.
135. Sell, S. (2006) Cancer stem cells and differentiation therapy. *Tumour Biol*. 27: 59-70.
136. Sethi, G., Ahn, K.S., Sandur, S.K., Lin, X., Chaturvedi, M.M., and Aggarwal, B.B. (2006) Indirubin enhances tumor necrosis factor-induced apoptosis through modulation of nuclear factor-kappa B signaling pathway. *J.Biol.Chem*. 281: 23425-23435.
137. Shah, M.A. and Schwartz, G.K. (2005) Cyclin-dependent kinases as targets for cancer therapy. *Cancer Chemother.Biol.Response Modif*. 22: 135-162.
138. Shankar, S. and Srivastava, R.K. (2007) Bax and Bak genes are essential for maximum apoptotic response by curcumin, a polyphenolic compound and cancer chemopreventive agent derived from turmeric, *Curcuma longa*. *Carcinogenesis*. 28: 1277-1286.
139. Shi, J. and Shen, H.M. (2008) Critical role of Bid and Bax in indirubin-3'-monoxime-induced apoptosis in human cancer cells. *Biochem.Pharmacol*. 75: 1729-1742.
140. Shishodia, S., Amin, H.M., Lai, R., and Aggarwal, B.B. (2005) Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappaB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochem.Pharmacol*. 70: 700-713.
141. Singer, O. and Verma, I.M. (2008) Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis. *Curr.Gene Ther*. 8: 483-488.
142. Singh, S. and Khar, A. (2006) Biological effects of curcumin and its role in cancer chemoprevention and therapy. *Anticancer Agents Med.Chem*. 6: 259-270.
143. Smetanska, I. (2008) Production of secondary metabolites using plant cell cultures. *Adv.Biochem.Eng Biotechnol*. 111: 187-228.
144. Stegmaier, K., Ross, K.N., Colavito, S.A., O'Malley, S., Stockwell, B.R., and Golub, T.R. (2004) Gene expression-based high-throughput screening(GE-HTS) and application to leukemia differentiation. *Nat.Genet*. 36: 257-263.
145. Steriti, R. (2002) Nutritional support for chronic myelogenous and other leukemias: a review of the scientific literature. *Altern.Med.Rev*. 7: 404-409.
146. Su, C.C., Lin, J.G., Li, T.M., Chung, J.G., Yang, J.S., Ip, S.W., Lin, W.C., and Chen, G.W. (2006) Curcumin-induced apoptosis of human colon cancer colo 205 cells through the production of ROS, Ca²⁺ and the activation of caspase-3. *Anticancer Res*. 26: 4379-4389.
147. Sun, Y.V., Boverhof, D.R., Burgoon, L.D., Fielden, M.R., and Zacharewski, T.R. (2004) Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences. *Nucleic Acids Res*. 32: 4512-4523.
148. Suzuki, Y.J., Forman, H.J., and Sevanian, A. (1997) Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic.Biol.Med*. 22: 269-285.
-

149. Tamaki, A., Hayashi, H., Nakajima, H., Takii, T., Katagiri, D., Miyazawa, K., Hirose, K., and Onozaki, K. (2004) Polycyclic aromatic hydrocarbon increases mRNA level for interleukin 1 beta in human fibroblast-like synoviocyte line via aryl hydrocarbon receptor. *Biol.Pharm.Bull.* 27: 407-410.
150. Von Low, E.C., Perabo, F.G., Siener, R., and Muller, S.C. (2007) Review. Facts and fiction of phytotherapy for prostate cancer: a critical assessment of preclinical and clinical data. *In Vivo.* 21: 189-204.
151. Vrzal, R., Ulrichova, J., and Dvorak, Z. (2004) Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. *Biomed.Pap.Med.Fac.Univ Palacky.Olomouc.Czech.Repub.* 148: 3-10.
152. Wang, J.B., Qi, L.L., Zheng, S.D., and Wu, T.X. (2009) Curcumin induces apoptosis through the mitochondria-mediated apoptotic pathway in HT-29 cells. *J.Zhejiang.Univ Sci.B.* 10: 93-102.
153. Wang, L., Zhou, G.B., Liu, P., Song, J.H., Liang, Y., Yan, X.J., Xu, F., Wang, B.S., Mao, J.H., Shen, Z.X., Chen, S.J., and Chen, Z. (2008) Dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Realgar-Indigo naturalis as an effective treatment for promyelocytic leukemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 105: 4826-4831.
154. Weintraub, S.J., Prater, C.A., and Dean, D.C. (1992) Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature.* 358: 259-261.
155. West, T., Atzeva, M., and Holtzman, D.M. (2006) Caspase-3 deficiency during development increases vulnerability to hypoxic-ischemic injury through caspase-3-independent pathways. *Neurobiol.Dis.* 22: 523-537.
156. Whitlock, J.P., Jr., Denison, M.S., Fisher, J.M., and Shen, E.S. (1989) Induction of hepatic cytochrome P450 gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Mol.Biol.Med.* 6: 169-178.
157. Williams, R.J., Spencer, J.P., and Rice-Evans, C. (2004) Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic.Biol.Med.* 36: 838-849.
158. Witulski, B., Alayrac, C., and Tevzadze-Saefel, L. (2003) Palladium-catalyzed synthesis of 2-aminoindoles by a heteroannulation reaction. *Angew.Chem.Int.Ed Engl.* 42: 4257-4260.
159. Woo, M.S., Jung, S.H., Kim, S.Y., Hyun, J.W., Ko, K.H., Kim, W.K., and Kim, H.S. (2005) Curcumin suppresses phorbol ester-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting the PKC to MAPK signaling pathways in human astrogloma cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 335: 1017-1025.
160. Yao, E.F. and Denison, M.S. (1992) DNA sequence determinants for binding of transformed Ah receptor to a dioxin-responsive enhancer. *Biochemistry.* 31: 5060-5067.

161. Yoshikawa, M., Murakami, T., Kishi, A., Sakurama, T., Matsuda, H., Nomura, M., Matsuda, H., and Kubo, M. (1998) Novel indole S,O-bisdesmoside, calanthoside, the precursor glycoside of tryptanthrin, indirubin, and isatin, with increasing skin blood flow promoting effects, from two *Calanthe* species (Orchidaceae). *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)*. 46: 886-888.
162. Zhang, S., Qin, C., and Safe, S.H. (2003a) Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environ.Health Perspect.* 111: 1877-1882.
163. Zhang, S., Qin, C., and Safe, S.H. (2003c) Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environ.Health Perspect.* 111: 1877-1882.
164. Zhang, S., Qin, C., and Safe, S.H. (2003b) Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environ.Health Perspect.* 111: 1877-1882.

VII. Anhang

Verwendete Abkürzungen:

Å	Ångström-Einheit (1 Å = 100 pm)
AHR	Arylhydrocarbon Rezeptor
AHRR	AHR-Repressor
αNF	Alpha-Naphtoflavon
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	AhR nuclear translocator
B(a)P	Benz(a)pyren
bHLH	Basic Helix-Loop-Helix
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CDK	Zyclin-abhängige Kinase
cDNA	komplementäre DNA
CP	Crossing point
CYP	Cytochrom P450
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiohreitrol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence-activated cell sorter/scanner
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FICZ	6-Formylindolo[3,2-b]carbazol
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
G-Phase	„gap“-Phase
h	Stunden
HaCaT	“human adult high calcium low temperature
Hrp	Horseraddishperoxidase (Meerrettichperoxidase)
Hsp90	Heatschock Protein 90

kD	Kilodalton
LD	Letale Dosis
m	milli- / Meter
M	mol pro Liter
μ	mikro
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute
mRNA	Boten-RNA
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MNF	3'-Methoxy-4'-Nitroflavon
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid
n	nano
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	Per-Arnt-Sim
PBS	Phosphate-buffered saline
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Rb	Retinoblastomprotein
RISC	RNA-induced-silencing-complex
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkriptase / Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodekylsulfat
sec	Sekunde
shRNA	“small hairpin RNA”
siRNA	“small interfering RNA”
S-Phase	Synthese-Phase
TCDD	2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Gewicht / Volumen
XRE	Xenobiotika-responsives Element

Anhang

Tabelle 8: Auflistung aller nach 24 h durch 100 µM Curcumin regulierten Gene in HL-60 Zellen

Öffentliche Gen ID	Gensymbol	-fache Regulierung
NM_015364	ly96	24,50
AA083483	fth1	17,65
AF180519	gabrapl1	11,95
BC001388	anxa2	11,46
NM_002133	hmox1	11,05
M55580	sat1	10,18
NM_003900	sqstm1	8,64
NM_002032	fth1	8,48
NM_000713	blvrb	8,24
NM_004039	anxa2	7,82
AFFX-M27830_5	---	7,59
NM_002970	sat1	7,44
NM_002395	me1	7,35
BE908217	anxa2	6,87
NM_003662	pir	6,41
BF680255	rps11	5,86
BE971383	sat1	5,85
NM_016061	ypel5	5,83
AF016266	tNFrsf10b	5,62
AB040875	slc7a11	5,60
NM_006931	slc2a3	5,49
J04755	fthp1	5,06
NM_006291	tNfaip2	5,06
AA488687	slc7a11	4,86
NM_000904	nqo2	4,77
AB018289	kiaa0746	4,30
AL161985	tfe3	4,10
NM_014856	dennd4b	4,02
M83248	spp1	3,93
NM_000903	nqo1	3,90
M23254	capn2	3,79
U16307	glipr1	3,78
S69738	cc12	3,61
AF113129	atp6v1a	3,48
NM_002061	gclm	3,45
NM_002964	s100a8	3,41
AFFX-M27830_M	---	3,38
AL534702	abhd3	3,27
NM_002305	lgals1	3,27
AJ400877	nrip3	3,24
BC000906	nqo1	3,18
BF125756	gabrapl1	3,12
NM_000700	anxa1	3,06
NM_003330	txnrd1	3,00
NM_006148	lasp1	2,95
NM_020529	NFkbia	2,93
BF670447	rhoq	2,90
NM_002778	psap	2,85
U70451	myd88	2,83
AF001294	phlda2	2,82
NM_001779	cd58	2,79
AI809341	ptprc	2,78

Anhang

NM_000637	gsr	2,77
NM_004844	sh3bp5	2,77
NM_024579	c1orf54	2,73
NM_005572	lmna	2,73
NM_030938	mirn21	2,71
NM_002110	hck	2,71
AF084462	rit1	2,68
NM_001629	alox5ap	2,67
BG538564	ftl	2,67
AV703259	ids	2,66
NM_021199	sqrcl	2,66
AI659005	lgals8	2,66
NM_002984	ccl4	2,64
NM_000594	tNF	2,63
NM_005625	sdcbp	2,62
BE312027	---	2,58
NM_006123	ids	2,57
BC001743	c7orf44	2,55
AI912583	glipr1	2,55
NM_022735	acbd3	2,54
AI819238	id2	2,54
BC001606	ncf2	2,54
D14826	crem	2,51
NM_016243	cyb5r1	2,51
AW302047	---	2,49
AI631159	slc2a3	2,48
L78132	lgals8	2,47
NM_000632	itgam	2,45
BC000687	tram1	2,45
BE893893	map1lc3b	2,45
NM_004120	gbp2	2,44
BC005122	arfgap3	2,44
AFFX-BioB-M	---	2,44
NM_016293	bin2	2,44
M32221	psap	2,42
M13975	prkcb1	2,42
AA775177	ptpre	2,41
NM_005953	mt2a	2,40
BC002827	tpm4	2,37
AI651213	ssh1	2,37
AFFX-r2-Ec-bioB-5	---	2,36
AF183417	map1lc3b	2,35
BE966922	stx3	2,34
X77598	lpxn	2,34
BC002439	htatip2	2,33
BC000603	rpl38	2,33
AFFX-r2-Ec-bioC-3	---	2,33
BC005930	cd58	2,33
NM_005178	bcl3	2,32
AFFX-BioB-3	---	2,31
BC000893	hist1h2bk	2,30
NM_003332	tyrobp	2,30
NM_002956	clip1	2,30
AI570834	nmt1	2,30
U16307	glipr1	2,30

Anhang

AI214061	tpm4	2,30
AFFX-BioB-5	---	2,29
AB020712	sec31a	2,29
AI797833	---	2,29
NM_002341	ltb	2,29
NM_001268	rcbtb2	2,29
AU153138	tmem41b	2,28
BC004395	apol2	2,28
BC005174	atf5	2,27
NM_012201	glg1	2,27
AI934569	asah1	2,26
NM_016947	c6orf48	2,26
AL564683	cebpb	2,25
AW303136	rpl38	2,25
NM_002029	fpr1	2,25
AB007892	cdc5l	2,24
AA194996	tmem39a	2,24
AL049699	me1	2,24
NM_025147	coq10b	2,23
NM_018678	---	2,23
D10537	mpz	2,23
AK026584	lmna	2,23
AI860431	psmd1	2,23
BC001689	slc25a20	2,22
AFFX-r2-Ec-bioB-M	---	2,22
U47674	asah1	2,21
M25915	clu	2,20
NM_001069	tubb2a	2,20
M25915	clu	2,20
NM_021127	pmaip1	2,20
NM_016618	krcc1	2,19
NM_000560	cd53	2,19
NM_001660	arf4	2,18
NM_016127	tmem66	2,18
AV703259	ids	2,18
NM_001760	ccnd3	2,18
NM_002668	plp2	2,17
BE439987	gas7	2,17
NM_014033	mettl7a	2,17
U84246	neu1	2,16
NM_002738	prkcb1	2,16
AF220028	trim5	2,16
BC005174	atf5	2,15
AFFX-r2-Ec-bioC-5	---	2,15
BC001049	ufd11	2,13
NM_006503	loc652826	2,12
AI890903	---	2,12
NM_000271	npc1	2,12
AI433464	---	2,12
NM_005384	NFil3	2,11
NM_003183	adam17	2,11
NM_014897	zNF652	2,11
NM_002796	psmb4	2,11
NM_002808	psmd2	2,10
AFFX-BioC-5	---	2,10

Anhang

AL110298	slc2a14	2,10
NM_013385	pscd4	2,09
NM_002957	rxra	2,09
NM_024906	scd5	2,09
Y00062	ptprc	2,09
NM_006283	tacc1	2,08
AV719355	---	2,08
AI091079	shc1	2,08
AK021440	bsdc1	2,08
H14241	flj20489	2,08
BG537190	ftl	2,08
AA890010	sec22b	2,08
L06147	golga2	2,07
N32035	stx7	2,06
NM_005620	s100a11	2,06
AI040009	rab3gap1	2,05
AI356412	lyn	2,05
NM_002056	gfpt1	2,05
NM_013360	zNF222	2,04
NM_001150	anpep	2,04
BC000835	psmb6	2,04
AK021884	loc440434	2,03
AA191573	synj2	2,03
NM_014399	tspan13	2,03
NM_022460	hs1bp3	2,03
AB011155	dlg5	2,03
AW340850	loc440434	2,03
AFFX-BioC-3	---	2,03
NM_023076	c16orf28	2,03
AA747426	ifrd1	2,03
NM_018269	adi1	2,02
AF281030	triobp	2,02
AFFX-r2-Ec-bioB-3	---	2,02
NM_001706	bcl6	2,02
NM_017801	cmtm6	2,01
BF439983	casp8	2,01
NM_002807	psmd1	2,01
AF020314	cd300a	2,00
BE857772	rpl37a	2,00
AF022375	vegfa	2,00
NM_012296	gab2	1,99
AA534198	csglca-t	1,99
NM_006599	NFat5	1,99
NM_016607	armcx3	1,98
NM_002983	ccl3	1,97
NM_014959	card8	1,97
AL080112	---	1,97
AW968555	tbl1x	1,97
AF257318	sh3glb1	1,97
BC002447	phtf1	1,96
AFFX-BioDn-5	---	1,96
D29642	arhgap25	1,96
NM_006437	parp4	1,96
AI039874	nqo1	1,96
BE617588	hpcal1	1,96

Anhang

NM_014882	arhgap25	1,96
BC001407	slc25a16	1,95
NM_014128	---	1,95
AA747426	ifrd1	1,95
AI744148	asciz	1,94
BC005975	cacybp	-1,93
BC002616	tagln2	-1,93
NM_025075	thoc7	-1,93
NM_016397	th11	-1,93
NM_012417	pitpnc1	-1,93
NM_000291	pgk1	-1,93
NM_014167	ccdc59	-1,94
AF040105	c6orf108	-1,94
AV702627	srp72	-1,94
BC001851	rap1gds1	-1,94
AI004009	---	-1,94
NM_016052	rrp15	-1,94
NM_013298	smcr71	-1,94
BF342707	prpf31	-1,94
U40053	cyp51a1	-1,94
NM_017767	slc39a4	-1,94
AF116273	bag1	-1,95
BC003621	hnrmpu	-1,95
NM_015904	EIF5B	-1,95
NM_018471	zc3h15	-1,95
NM_004499	hnrpab	-1,95
NM_004280	eef1e1	-1,95
AA927724	aprt	-1,96
NM_004710	syng2	-1,96
BE542684	EIF1AX	-1,96
AA551784	carm1	-1,96
NM_012099	cd3eap	-1,96
NM_014739	bclaf1	-1,96
AA398569	LOC91316	-1,96
NM_012341	gtpbp4	-1,96
NM_000436	oxct1	-1,96
BC000586	scly	-1,96
U76248	siah2	-1,96
D80000	smc1a	-1,97
NM_005013	nucb2	-1,97
AA902652	paics	-1,97
N54448	hrsp12	-1,97
NM_000048	asl	-1,97
AF091086	coq2	-1,97
NM_005381	ncl	-1,97
NM_001889	cryz	-1,97
NM_014474	smpd3b	-1,97
NM_024662	nat10	-1,97
AF151813	serbp1	-1,97
BE730433	serbp1	-1,97
BC001441	skp2	-1,98
NM_014185	rangrf	-1,98
NM_003915	cpne1	-1,98
AI339331	glud1	-1,98
NM_004392	dach1	-1,98

Anhang

AB049113	dut	-1,98
BC005299	cycs	-1,98
NM_015380	samm50	-1,98
NM_016459	mgc29506	-1,98
NM_014214	impa2	-1,99
NM_005886	katnb1	-1,99
NM_005505	scarb1	-1,99
NM_002539	odc1	-1,99
AF275803	cacybp	-1,99
NM_003365	uqrc1	-1,99
AL547263	pdc11	-1,99
NM_031209	qtrt1	-1,99
BC005383	cetn3	-1,99
NM_024837	atp8b4	-1,99
AL157420	wdr57	-1,99
NM_002949	mrpl12	-1,99
BC006351	wdr74	-1,99
NM_004889	atp5j2	-1,99
BG530850	ddx18	-2,00
NM_006307	srpx	-2,00
NM_016551	tm7sf3	-2,00
NM_002452	nudt1	-2,00
NM_003761	vamp8	-2,00
NM_016199	lsm7	-2,00
AW268640	EIF4E	-2,00
L22253	sfrs7	-2,00
AI948503	abcc4	-2,00
BC004998	fam62a	-2,00
NM_002629	hcg_2015138	-2,00
NM_016283	taf9	-2,00
NM_014342	mtch2	-2,01
AI871287	homer3	-2,01
AL136679	qrs11	-2,01
NM_005022	pfn1	-2,01
NM_004094	EIF2S1	-2,01
NM_022743	smyd3	-2,01
AF061730	glod4	-2,01
NM_016017	uchl5	-2,01
AI435302	tsn	-2,02
NM_005825	rasgrp2	-2,02
NM_017971	mrpl20	-2,02
BC006230	mgll	-2,03
AW246673	fam46a	-2,03
NM_000349	star	-2,03
M69040	sfrs1	-2,03
U56085	pwp2	-2,03
NM_018288	phf10	-2,03
AJ224869	cxcr4	-2,03
BE798517	atp5d	-2,03
NM_022490	polr1e	-2,03
NM_002707	ppm1g	-2,04
NM_004868	gpsn2	-2,04
AF254822	smarca4	-2,04
NM_021204	enoph1	-2,04
J03223	srgn	-2,04

Anhang

BF508848	pnn	-2,04
U37689	polr2h	-2,04
AI738965	mfng	-2,05
AI796581	ncapd3	-2,05
AF141870	ilf3	-2,05
NM_001928	cfb	-2,05
NM_002097	gtf3a	-2,05
NM_005692	abcf2	-2,05
BE795648	ssrp1	-2,05
BC003049	serbp1	-2,05
BE262760	ube2n	-2,06
NM_018130	shq1	-2,06
U79718	nth1	-2,06
NM_014829	ddx46	-2,06
NM_001096	acly	-2,06
AB028957	satb2	-2,06
BC000731	syng1	-2,06
AB011154	cep68	-2,06
NM_001687	atp5d	-2,06
NM_003142	ssb	-2,06
U34994	prkdc	-2,07
AF226604	oprs1	-2,07
BC000245	nsdhl	-2,07
NM_004493	hsd17b10	-2,07
BG029917	psmf1	-2,07
BE903880	cd44	-2,07
NM_020186	acn9	-2,07
AI635449	slc39a6	-2,07
AB002330	sr140	-2,08
NM_004794	rab33a	-2,08
NM_003142	ssb	-2,08
NM_031210	c14orf156	-2,08
NM_016400	hypk	-2,08
AF172268	tnik	-2,08
AL162079	slc16a1	-2,08
NM_016649	esf1	-2,09
NM_016579	cd320	-2,09
AF001903	hadh	-2,09
AL520908	syncrip	-2,09
AA868754	smchd1	-2,09
NM_015984	uchl5	-2,09
NM_001412	eif1ap1	-2,09
NM_005000	ndufa5	-2,09
BE966374	ybx1	-2,09
U08626	glul	-2,09
AL021786	itm2a	-2,09
NM_006729	diaph2	-2,10
NM_006114	tomm40	-2,10
AW299245	c12orf29	-2,10
NM_004461	farsa	-2,10
NM_006109	prmt5	-2,10
NM_025207	flad1	-2,10
NM_004356	cd81	-2,10
AL353950	ppp3ca	-2,11
NM_014867	kbtbd11	-2,11

Anhang

U59151	dkc1	-2,11
NM_002853	rad1	-2,11
NM_001827	cks2	-2,11
NM_013375	abt1	-2,12
NM_002765	prps2	-2,12
NM_000075	cdk4	-2,12
AC004079	---	-2,12
BC004170	pole3	-2,12
BG395660	ube2g2	-2,12
NM_015971	mrps7	-2,12
AI357401	paxip1	-2,12
BF972185	gadd45gip1	-2,13
BF975273	wdr77	-2,13
BG389015	tpd52	-2,13
BC003376	elavl1	-2,13
U87954	pa2g4	-2,13
Y07846	gas2l1	-2,14
NM_001363	dkc1	-2,14
NM_005375	myb	-2,14
NM_006427	siva1	-2,14
AW026491	ccnd2	-2,14
NM_024096	xtp3tpa	-2,14
NM_001355	ddt	-2,14
NM_022341	cog8	-2,14
NM_016542	rp6-213h19.1	-2,14
L03419	fcgr1b	-2,15
NM_001640	apec	-2,15
NM_024057	nup37	-2,15
NM_002940	abce1	-2,15
BC001686	mat2a	-2,15
AA133341	glrx5	-2,15
BC005895	cox11	-2,15
NM_014038	bzw2	-2,15
NM_003730	rnaset2	-2,15
AB018284	eif5b	-2,16
BE898861	hnrnp	-2,16
NM_001328	ctbp1	-2,16
D79994	ankrd15	-2,16
NM_012394	pfdn2	-2,16
AA628948	adss	-2,16
AF302110	aasdhppt	-2,16
AL136179	sox4	-2,17
NM_018502	tmco6	-2,17
BC003375	mrpl3	-2,17
BC003186	gins2	-2,17
AI738965	mfng	-2,17
NM_001752	cat	-2,17
NM_017840	mrpl16	-2,17
NM_002764	prps1	-2,17
BC005147	fkbp1a	-2,17
AA723370	fahd2a	-2,18
NM_003504	cdc45l	-2,18
AI346504	c14orf109	-2,18
NM_003234	tfr	-2,18
NM_005932	mipep	-2,18

Anhang

NM_024430	pstpip2	-2,18
NM_017835	c21orf59	-2,19
NM_002634	phb	-2,19
R39094	eif4ebp3	-2,19
NM_018380	ddx28	-2,20
M13231	tarp	-2,20
NM_002358	mad2l1	-2,20
NM_006335	timml7a	-2,20
NM_016034	mrps2	-2,20
BE305165	ppp1r14b	-2,20
NM_002902	rcn2	-2,20
M80261	apex1	-2,20
NM_013332	hig2	-2,21
NM_003002	sdhd	-2,21
AB049113	dut	-2,21
NM_013285	gnl2	-2,21
NM_004704	rrp9	-2,21
NM_016399	triap1	-2,21
NM_003689	akr7a2	-2,22
NM_002872	rac2	-2,22
NM_006230	pold2	-2,22
NM_001237	ccna2	-2,22
NM_004875	polr1c	-2,22
NM_014175	mrpl15	-2,22
NM_001239	ccnh	-2,22
NM_023933	c16orf24	-2,22
AB018310	dip	-2,22
AF309553	wdr61	-2,23
BF224073	tcp1	-2,23
BC000447	mif	-2,23
NM_003040	slc4a2	-2,23
BC002906	uck2	-2,24
AB040120	slc39a8	-2,24
NM_002437	mpv17	-2,24
BC002552	hmg20b	-2,24
AB044548	eif4ebp1	-2,24
NM_014174	thyn1	-2,24
NM_005035	polrmt	-2,25
NM_004343	calr	-2,25
BC004421	zNF330	-2,25
AV745949	scamp1	-2,25
NM_013411	ak2	-2,25
NM_016640	mrps30	-2,25
AF092131	ndufv1	-2,25
AV650470	suclg2	-2,25
NM_018126	tmem33	-2,26
NM_012458	timml3	-2,26
NM_003969	ube2m	-2,26
NM_006716	dbf4	-2,27
X14355	fcgr1a	-2,27
NM_002128	hmgb1	-2,27
D86962	grb10	-2,27
NM_016044	fahd2a	-2,28
AV728268	c11orf32	-2,28
NM_016619	plac8	-2,28

Anhang

NM_004301	actl6a	-2,28
D86062	c21orf33	-2,28
NM_014252	slc25a15	-2,30
AF327722	narg1	-2,30
NM_017735	ttc27	-2,30
BF983379	cd59	-2,30
NM_031206	las1l	-2,30
NM_000484	app	-2,30
AL542571	grpel1	-2,31
NM_007043	krr1	-2,31
NM_002065	glul	-2,31
AI341234	coro1b	-2,31
BF672975	lpl	-2,31
NM_017829	cecr5	-2,31
AI554759	polr2e	-2,32
L01639	cxcr4	-2,32
NM_004341	cad	-2,32
BC003068	slc19a1	-2,33
M37712	gpr125	-2,33
U17496	psmb8	-2,33
NM_000375	uros	-2,33
BG538627	tmem123	-2,34
NM_003641	ifitm1	-2,34
M27331	tarp	-2,34
AA811192	rrp1b	-2,34
NM_018060	iars2	-2,34
NM_004867	itm2a	-2,34
NM_002157	hspe1	-2,34
AL520908	syncrip	-2,35
NM_014350	tNfaip8	-2,35
BC002571	abhd14a	-2,35
NM_013410	ak31l /// ak312 /// loc645619	-2,36
AL553320	stip1	-2,36
NM_021830	peo1	-2,36
NM_000206	il2rg	-2,36
NM_014878	kiaa0020	-2,36
D50692	mycbp	-2,36
AI826075	ctglf1	-2,37
AW514900	c19orf2	-2,37
AL581473	exosc7	-2,37
NM_018099	mlstd1	-2,38
M55905	me2	-2,38
BF195608	tbc1d2b	-2,38
NM_002408	mgat2	-2,38
NM_001384	dph2	-2,38
BE906054	gspt1	-2,39
NM_004578	rab4a	-2,39
NM_018983	nola1	-2,39
NM_005886	katnb1	-2,39
NM_014367	c3orf28	-2,40
AF037448	syncrip	-2,40
BE256479	hspd1	-2,40
D83781	nup160	-2,40
NM_004772	c5orf13	-2,40
NM_015907	lap3	-2,41

Anhang

AF130103	pebp1	-2,41
NM_000956	ptger2	-2,41
AL545982	cct2	-2,41
NM_014765	tomm20	-2,41
NM_005138	sco2	-2,42
NM_004758	bzrap1	-2,42
NM_025215	pus1	-2,43
BC000325	dpagt1	-2,44
BE407516	ccnb1	-2,44
NM_005866	oprs1	-2,45
NM_024006	vkorc1	-2,45
BG290646	ube2n	-2,45
NM_018492	pbk	-2,45
NM_002863	pygl	-2,46
BE965029	mical2	-2,47
NM_004643	pabpn1	-2,47
AF067854	adsl	-2,47
U88968	eno1	-2,48
AI688580	med21	-2,48
NM_004056	ca8	-2,49
BE962354	tctn3	-2,49
NM_024537	cars2	-2,49
AF251062	rbm13	-2,49
BC001327	ifrd2	-2,49
AL080089	atp5g1	-2,50
NM_004237	trip13	-2,50
BC001188	tfrc	-2,50
M64497	nr2f2	-2,50
AF083033	prkra	-2,50
AL556190	csda	-2,50
NM_021095	slc5a6	-2,51
M21154	amd1	-2,51
NM_004955	slc29a1	-2,51
S81916	pgk1	-2,51
AI932370	sacs	-2,52
BF512200	mbn1	-2,52
BC002488	serbp1	-2,52
BF669264	pa2g4	-2,52
NM_003405	ywhah	-2,52
AI885411	flj22222	-2,53
NM_018256	wdr12	-2,53
NM_004735	lrrfip1	-2,54
NM_015969	mrps17	-2,54
NM_024540	mrpl24	-2,55
NM_012456	timm10	-2,55
NM_015871	zNF593	-2,55
NM_003090	snrpa1	-2,56
NM_006993	npm3	-2,57
X98743	ddx18	-2,58
AU153477	lsm5	-2,58
AI630178	slc43a3	-2,58
AL037557	polr2i	-2,59
NM_024805	c18orf22	-2,60
NM_003362	ung	-2,60
NM_018072	heatr1	-2,60

Anhang

AL049842	nufip1	-2,61
NM_003187	taf9	-2,61
NM_004741	nolc1	-2,61
AA181179	camkk2	-2,61
BE670928	mdn1	-2,61
NM_004728	ddx21	-2,62
NM_016101	nip7	-2,62
NM_002643	pigf	-2,62
NM_004134	hsps9	-2,62
BC000149	rfc3	-2,62
NM_005566	ldha	-2,62
NM_000269	nme1	-2,63
AL031230	aldh5a1	-2,63
NM_013976	gcdh	-2,63
NM_024678	nars2	-2,63
NM_022817	per2	-2,63
NM_006326	tmem147	-2,63
AV701173	seh11	-2,64
AY028632	cat	-2,64
NM_022366	tfb2m	-2,64
NM_016292	trap1	-2,64
NM_004298	nup155	-2,65
NM_014165	c6orf66	-2,66
NM_024696	bahcc1	-2,67
NM_022451	noc3l	-2,67
AU151801	clqbp	-2,68
AF348491	cxc4	-2,68
AC004472	stoml2	-2,69
AK025608	c22orf9	-2,70
NM_003720	dscr2	-2,70
BE747342	imp4	-2,70
NM_016598	zdhhc3	-2,70
AI743792	st6gal1	-2,71
NM_000254	mtr	-2,72
NM_002014	fkbp4	-2,72
U49844	atr	-2,72
AF309553	wdr61	-2,72
NM_001444	fabp5	-2,72
U47077	prkdc	-2,72
NM_006784	wdr3	-2,73
NM_003488	akap1	-2,73
U39945	ak2	-2,74
AW007751	tra@	-2,74
AF109161	cited2	-2,74
NM_003171	supv3l1	-2,75
AF080216	bcl11a	-2,76
NM_006602	tcfl5	-2,77
AI700633	---	-2,77
AI693140	xylt1	-2,77
NM_016299	hsps14	-2,79
AW277253	ak2	-2,80
NM_012280	ftsj1	-2,80
BG532690	itga4	-2,80
NM_006848	ccdc85b	-2,81
BE542684	eif1ax	-2,81

Anhang

BC001648	wdr18	-2,82
NM_014285	exosc2	-2,83
BC000009	nola2	-2,83
NM_006406	prdx4	-2,84
NM_001911	ctsg	-2,85
BE969671	pebp1	-2,86
AF305083	fut4	-2,87
AL551971	prmt3	-2,88
NM_002882	ranbp1	-2,89
X15306	nefh	-2,89
BG034328	tfdp2	-2,90
NM_001759	ccnd2	-2,91
NM_004515	ilf2	-2,91
NM_020143	pno1	-2,93
NM_023009	marcks11	-2,93
NM_000819	gart	-2,93
NM_005956	mthfd1	-2,94
NM_006666	ruvb12	-2,95
NM_002567	pebp1	-2,96
NM_024658	ipo4	-2,96
M55575	bckdhh	-2,97
NM_002014	fkbp4	-2,97
AA593983	smarcc1	-2,97
AL037401	nr2f2	-2,98
AA135522	gpd11	-2,98
NM_000019	acat1	-2,98
NM_004398	ddx10	-2,99
W02312	ak2	-3,00
M58596	fut4	-3,00
NM_018386	pcid2	-3,02
T62571	map7	-3,02
BC005352	tNfaip8	-3,03
NM_003707	ruvb11	-3,04
BC000270	macrod1	-3,04
NM_003628	pkp4	-3,04
NM_005327	hadh	-3,05
BC000947	ranbp5	-3,05
BG491842	bop1	-3,10
AW237404	gsh	-3,12
D55716	mcm7	-3,13
NM_017528	wbscr22	-3,13
AI984421	grpel1	-3,14
NM_021076	nefh	-3,17
AL044326	pfas	-3,17
NM_002934	rnase2	-3,18
NM_002634	phb	-3,19
AF274950	c12orf11	-3,20
NM_018476	bex1	-3,20
AL136784	ankrd27	-3,22
AI890972	pdzd8	-3,22
NM_017802	heatr2	-3,22
NM_005833	rabepk	-3,23
NM_006384	cib1	-3,24
NM_000666	acy1	-3,28
NM_020158	exosc5	-3,28

Anhang

AA587905	mrps12	-3,31
NM_003550	mad111	-3,33
NM_014788	trim14	-3,34
NM_004214	fibp	-3,35
AI688812	rasgrp2	-3,36
D55674	hnrpd	-3,37
Z95126	hcg_1644608	-3,40
NM_003645	slc27a2	-3,41
NM_004595	sms	-3,41
NM_002564	p2ry2	-3,43
NM_000270	np	-3,43
BC000576	qdpr	-3,43
NM_001536	prmt1	-3,45
X06557	tra@	-3,45
AI692341	rpia	-3,45
BG434893	pms1	-3,48
BE730433	serbp1	-3,51
BE965029	mical2	-3,55
BE314601	hspc111	-3,56
BC003163	slc43a3	-3,60
NM_006824	ebna1bp2	-3,60
NM_016183	mrto4	-3,62
NM_002402	mest	-3,64
NM_006295	vars	-3,72
NM_006443	c6orf108	-3,74
NM_001828	clc	-3,82
NM_013300	c12orf24	-3,87
NM_018014	bcl11a	-3,89
L04636	c1qbp	-3,91
AD000092	farsa	-3,94
NM_003132	srm	-3,94
X72501	tra@ /// trd@	-3,96
NM_000633	bcl2	-4,07
NM_019042	pus7	-4,17
NM_000237	lpl	-4,17
NM_016391	hspc111	-4,20
NM_015956	mrpl4	-4,20
NM_016286	dcxr	-4,21
NM_024669	ankrd55	-4,22
NM_005887	dleu1	-4,22
BC005929	prg2	-4,29
NM_003074	smarcc1	-4,37
NM_024098	ccdc86	-4,37
AI970157	gsh /// loc654085 /// loc730107	-4,38
NM_001700	azu1	-4,39
AF279900	mcm7	-4,41
NM_021800	dnajc12	-4,47
BE879367	akap2 /// palm2-akap2	-4,54
NM_002467	myc	-4,55
AL022327	mlc1	-5,23
NM_002094	gspt1	-5,28
NM_018010	ift57	-5,63
NM_001972	ela2	-6,00
NM_007203	akap2 /// palm2-akap2	-6,11
J02694	mpo	-6,78

Anhang

L35848	ms4a3	-8,14
NM_000250	mpo	-9,88
AL556409	gal	-12,23
NM_005024	serpinb10	-13,27
NM_020070	igll1	-25,45
NM_002777	prtn3	-42,95

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für umweltmedizinische Forschung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH vom 01.09.2005 – 30.06.2008 mit finanzieller Unterstützung der Jose Carreras Leukämie Stiftung erstellt.

Teile der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung eingereicht:

Eingereicht *Anticancer Research*, 03/2009:

The arylhydrocarbon receptor is only marginally involved in the anti-leukemic effects of its ligand Curcumin

Andreas Goergens, Markus Frericks, Charlotte Esser

Danksagung

Frau Prof. Charlotte Esser danke ich für die Vergabe des interessanten Themas, die Unterstützung und die wissenschaftliche Führung.

Herrn Prof. Dr. Peter Proksch danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Frau Prof. Dr. Irmgard Förster danke ich für die Unterstützung zur Beendigung dieser Arbeit.

Dr. Bettina Jux danke ich für die moralische Unterstützung und die regen fachlichen und ausserfachlichen Diskussionen, die meine Arbeit vorangebracht haben.

Stephie Kadow danke ich für die gute Büropartnerschaft.

Dr. Markus Frericks danke ich für die Hilfe zum theoretischen Verständnis und die Auswertung der Microarrays.

Ninon Krahnke-Schoelzel, Babette Martiensen, Alla Velgach, Swantje Steinwachs und Irina Podolski danke ich für die technische Unterstützung im Laboralltag.

Meiner Frau Laura danke ich für die Energie, die mir aus schwierigen Phasen heraus geholfen hat und den Glauben an mich.

Meiner Familie und besonders meinem Vater danke ich für die Geduld und das Vertrauen in mich und meine Arbeit.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Die Bedeutung des Arylhydrocarbon Rezeptors für die antileukämische Wirkung von Flavonoiden und Indolen“ selbständig verfasst und neben den angegebenen Quellen keine weiteren Hilfsmittel verwendet habe. Die Dissertation wurde in der vorliegenden oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 14. April 2009