

UNTERSUCHUNGEN ZUR
EXPRESSION UND INDUKTION VON
ARYLHYDROKARBON-REZEPTOR
REGULIERTEN GENEN IN
GEWEBEN DER MAUS

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR
ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT DER
HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

VORGELEGT VON

DIPLOM-BIOLOGE
THORSTEN BERNSHAUSEN

AUS KEMPEN

NOVEMBER 2007

Aus dem Institut für umweltmedizinische Forschung
an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf gGmbH.

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

Referent: Prof. Dr. Josef Abel
Koreferent: Prof. Dr. Frank Wunderlich

Tag der mündliche Prüfung: 21.01.2008

Die relative Wahrheit der Wissenschaft hängt an der Möglichkeit ihrer Widerlegung. Nur solange Wissenschaft ein Prozeß bleibt, in dem das Geltende ständig kritisch überprüft wird, kann der äußerste Irrtum vermieden werden. Der Triumph der Wissenschaft liegt nicht in der endgültigen Erkenntnis, die vielmehr unmöglich ist; er liegt in der Widerlegung bisher für richtig gehaltener Theorien und Gesetze und der dadurch begründeten Chance der Formulierung besserer Theorien und Gesetze. Gegenseitige Kritik ist daher das oberste Prinzip der Ethik der Forschung.

Ralf Dahrendorf, *Ungewißheit, Wissenschaft und Demokratie* (1964)

Für meine geliebte Familie!
In Dank und Anerkennung für die langjährige Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Der Arylhydrokarbon-Rezeptor	2
1.1.1 Funktion, Struktur und Liganden	2
1.1.2 Rolle des AhR bei Zellwachstum und Zelldifferenzierung	11
1.1.3 Einfluß des AhR auf die Zellregulation	12
1.2 Die Leber	13
1.2.1 Funktion	13
1.2.2 Aufbau	14
1.2.3 Hepatozyt	15
1.2.4 Kultivierung von Leberzellen	16
1.3 Zielsetzung	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Haltung und Behandlung von Mäusen	19
2.1.1 Versuchstierhaltung	19
2.1.2 Applikation von Substanzen und Organentnahme an Mäusen	20
2.2 Kultivierung primärer Leberzellen	20
2.2.1 Entnahme von fötalen Leberanlagen	20
2.2.2 Isolation und Kultivierung der primären fötalen Leberzellen	21
2.2.3 Allgemeine Zellkulturmethoden	23
2.2.4 Bestimmung der DNA-Synthese	24
2.2.5 Bestimmung der Proliferation mit dem CellTiter-Blue-Kit	24

2.2.6	May-Grünwald-Giemsa-Färbung	25
2.2.7	Immunozytochemischer Nachweis von Albumin und des EGFR . .	25
2.3	Molekularbiologische Methoden	26
2.3.1	Nukleinsäure-Präparation	26
2.3.2	cDNA-Synthese	27
2.3.3	Polymerasekettenreaktion	28
2.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	30
2.4	Proteinchemische Methoden	30
2.4.1	Isolation von Proteinen	30
2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	32
2.4.3	Western-Blot Nachweis von Albumin, AhRR, EGFR, ERK1/2 und GAPDH	32
2.5	Datenanalyse	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Ergebnisse der <i>in vivo</i> -Untersuchungen	37
3.1.1	Expressionsanalyse des <i>AhRR</i> in adulten Mäusen	37
3.1.2	Der AhR reguliert die konstitutive Expression des <i>AhRR</i>	38
3.1.3	Effekte von B[a]P auf die Expression von <i>AhRR</i> mRNA und <i>CYP1A1</i> mRNA in unterschiedlichen Geweben der Maus	39
3.1.4	Expression von <i>AhR</i> und <i>AhRR</i> mRNA während der fötalen Le- berreifung	42
3.2	Untersuchung primärer fötaler Leberzellen	45
3.2.1	Morphologische Analyse der fötalen Leberzellkultur	45
3.2.2	Proliferation fötaler Leberzellen	50
3.2.3	Molekularbiologische Charakterisierung fremdstoffmetabolisierenden Enzymen in fötalen Leberzellen	51
3.3	Einfluß von TCDD auf die Replikation fötaler Leberzellen	55
3.3.1	Einfluß von TCDD auf die DNA-Synthese	55
4	Diskussion	62
4.1	Adulte Gewebeverteilung und Funktion des <i>AhRR</i>	62
4.2	Expression von <i>AhR</i> und <i>AhRR</i> in der fötalen Leber	68

4.3	Kultivierung primärer fötaler muriner Leberzellen	70
4.4	Einfluß des AhR auf die Zellregulation	74
4.5	Einordnung dieser Arbeit	81
	Zusammenfassung	82
	Abstract	83
	Literatur	84
	Danksagung	A
	Veröffentlichungen	C

Abbildungsverzeichnis

1.1	Vergleichsschema der funktionellen Domänen von AhR, ARNT und AhRR	3
1.2	Chemische Struktur einiger AhR-Liganden	5
1.3	Bildung von aktiven AhR-Liganden ausgehend von Tryptophan	7
1.4	Schema der AhR-abhängigen Genregulation	9
1.5	Feinbau der Leber	14
3.1	Gewebeverteilung der <i>AhRR</i> mRNA in adulten weiblichen und männlichen C57BL/6 Mäusen	38
3.2	Gewebeverteilung der <i>AhRR</i> mRNA in AhR-Wildtyp und AhR ^{-/-} -C57BL/6 Mäusen	39
3.3	B[a]P-induzierte <i>AhRR</i> mRNA-Expression in unterschiedlichen Geweben von C57BL/6-Mäusen	40
3.4	Einfluß von B[a]P auf die <i>CYP1A1</i> -Expression	41
3.5	Analyse der <i>AhR</i> und <i>AhRR</i> mRNA-Expression in der Leber zu den Trächtigkeitstagen GD 13.5, GD 15.5 und GD 17.5, sowie neugeborenen Mäusen	43
3.6	Nachweis der nukleären Lokalisation des AhRR mittels Western-Blot-Analyse	44
3.7	Lichtmikroskopische Aufnahme von fötalen Leberzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Kultur	46
3.8	Morphologische Charakterisierung der fötalen Leberzellen nach MGG-Färbung	47
3.9	Immunzytochemischer Nachweis des Hepatozytenmarkers Albumin in fötalen Leberzellen	49
3.10	Bestimmung der Proliferation fötaler Leberzellen mit dem CellTiter-Blue-Kit	50

3.11	Induzierbarkeit AhR-abhängiger Gene in fötalen Leberzellen in Abhängigkeit zum Induktor	54
3.12	Einfluß von TCDD auf die Proliferation kultivierter Leberzellen	56
3.13	Transiente Internalisierung des EGFR nach TCDD-Belastung von fötalen Leberzellen	58
3.14	Analyse der TCDD-abhängigen EGFR-Aktivierung im Western-Blot	59
3.15	Nachweis der AhR-abhängigen EGFR-Aktivierung	60
3.16	Einfluß von TCDD auf die Phosphorylierung von ERK1/2	61
4.1	Schema der AhR-abhängigen Mechanismen der hepatischen Zellregulation	80

Tabellenverzeichnis

2.1	Eingesetzte Zellzahl in entsprechende Zellkulturgefäße	22
2.2	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	29
2.3	Verwendete Antikörper	35
3.1	Konstitutive Expression fremdstoffmetabolisierende Enzyme der Phase I	52

Abkürzungsverzeichnis häufig verwendeter Begriffe

3'-M-4'-NF	3'-Methoxy-4'-Nitroflavon
Abb.	Abbildung
AhR	Arylhydrokarbon-Rezeptor
AhRR	Arylhydrokarbon-Rezeptor-Repressor
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	Arylhydrokarbon-Rezeptor-Nuklear-Transporter
ATP	Adenosintriphosphat
B[a]P	Benzo[a]pyren
bHLH	basic helix-loop-helix
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CYP	Cytochrom-P450
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extrazellular-Signal regulierte Kinase
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kalberserum
$\times g$	vielfaches der Erdbeschleunigung $g = 9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$

Abkürzungsverzeichnis

h	Stunde(n)
i.p.	inter peritoneal
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
l	Liter
μ	Mikro (10^{-6})
m	Milli (10^{-3})
M	Molare Masse (Quotient aus Masse und Stoffmenge eines Stoffes)
Mg ²⁺	Magnesiumkationen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGG-Färbung	May-Grünwald-Giemsa-Färbung
min	Minute(n)
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Boten Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
n	Nano (10^{-9})
<i>p</i>	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAS	Per-ARNT-Sim
PBS	Phosphatgepufferte Natriumlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylflourid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
sek	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat

Abkürzungsverzeichnis

TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS-T	Tris-Borat-Saline-Tween-20-Puffer
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ü.N.	über Nacht
U	Weißeinheit
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
Vol	Volumen/-anteil
w/v	Gewichtsprozent

Konvention zur Schreibweise von Genen und Proteinen

Die Namen der Gene und deren mRNA werden *kursiv* und die Proteine aufrecht geschrieben.

1 Einleitung

Ein primäres Zielorgan von ubiquitären Umweltchemikalien ist die Leber. Je nach Inkorporationsweg, inhalativ, dermal oder oral gelangen Noxen über die Pfortader (*Vena portae*) zur Leber. Dort interagieren Chemikalien mit zellulären Proteinen und können als Ursache von metabolischen und neoplastischen Lebererkrankungen angesehen werden. Die Chemikalien-Protein-Interaktion geschieht auf unterschiedlichem Wege. Chemikalien können substratspezifisch von Proteinen metabolisiert werden oder können spezifisch an Rezeptoren binden. Die Metabolisierung verändert physikochemische Eigenschaften von Stoffen, aus der eine Änderung der intrinsischen biologischen Aktivität resultiert. Die Metabolisierung kann zu einer Detoxifizierung und Elimination der entstandenen Metabolite führen oder zur Toxifizierung, bei der die Metabolite schädigend mit Proteinen oder Zellbestandteilen interagieren.

Die chemikalienabhängige Bindung an zytosolische Rezeptoren führt zur Auslösung differenzierter Signalkaskaden. Zu diesen Rezeptoren zählen eine Vielzahl von nukleären xenobiotischen Transkriptionsfaktoren, wie der Arylhydrokarbon-Rezeptor (AhR), der konstitutive Androstan-Rezeptor (CAR), der Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptor (PPAR), oder der Pregnan-X-Rezeptor (PXR). Diese im Zytosol lokalisierten Enzyme binden die als Ligand bezeichnete chemische Verbindung und translozieren in den Nukleus. Im Kern moduliert der Ligand-Rezeptor-Komplex die Transkription bestimmter Gene und löst weitere Signalkaskaden aus.

Bei der Wirkung von Umweltchemikalien auf das Zielorgan Leber spielt insbesondere der ligandeninduzierte Einfluß des Transkriptionsfaktors Arylhydrokarbon-Rezeptor (AhR) eine wichtige Rolle. Dabei wirkt dieser mitentscheidend auf die Zellregulation in der Leber und auf die Expression von AhR-abhängigen Genen.

1.1 Der Arylhydrokarbon-Rezeptor

1.1.1 Funktion, Struktur und Liganden

Die durch Umweltchemikalien vermittelten toxischen und biochemischen Reaktionen können auf die Interaktion mit zellulären Proteinen zurückgeführt werden. Dabei können Substanzen unter anderem modulierend auf die Transkription bestimmter Gene wirken. Dies wird über die Interaktion niedermolekularer Noxen mit ligandenabhängigen Transkriptionsfaktoren vermittelt.

Bereits 1972 erkannten Gielen et al. eine Variation in der Induzierbarkeit der Arylhydrokarbon-Hydroxylase-Aktivität (AHH) durch den Induktor 3-Methylcholanthren zwischen den Mausstämmen C57BL/6N und DBA/2N. Der für die Induktion der Expression von *AHH*, und einigen anderen Genen verantwortliche Transkriptionsfaktor wurde 1976 durch Ligandenbindungsanalysen von Poland und Mitarbeitern (Poland et al., 1976) als Arylhydrokarbon-Rezeptor identifiziert. Später konnten Polymorphismen im *Ahr* Allel die unterschiedliche Empfindlichkeit der untersuchten Mäusestämme begründen. Die um das 10-fach schwächer responsive DBA/2N Maus, mit dem Allel *Ahr^d*, kodiert am Kodon 375 die Aminosäure Valin gegenüber der C57BL/6 Maus mit der Aminosäure Alanin am Kodon 375 des AhR-Allels *Ahr^b* (Ema et al., 1994).

Ein weiterer physiologisch relevanter Polymorphismus im *Ahr* Allel ist in Han/Wistar Ratten bekannt. Dieser Polymorphismus in der Transaktivierungsdomäne ist für die extreme Unempfindlichkeit diesen Rattenstamms gegenüber AhR-Liganden im Vergleich zu anderen Rattenstämmen verantwortlich (Harper et al., 2006).

Der AhR wird in unterschiedlichen Geweben differentiell exprimiert und diese Regulation kann durch chemische wie biologische Faktoren beeinflusst werden (Harper et al., 2006). Die zelluläre Lokalisation des AhR wird durch die Zelldichte (Ikuta et al., 2004a) bzw. über die Phosphorylierung der nukleären Lokalisationsequenz (NLS) (Ikuta et al., 2004b) ligandenunabhängig determiniert.

Proteinstruktur des AhR und verwandter Proteine

Der AhR und die mit dem AhR-Signalweg assoziierten Proteine AhR-Nuclear-Translokator (ARNT) und Arylhydrokarbon-Rezeptor-Repressor (AhRR) gehören der basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim (bHLH/PAS) Proteinfamilie an (Gu et al., 2000; Taylor und

Zhulin, 1999). Diese große Gruppe von Proteinen ist an der embryonalen Entwicklung und der Regulation von Wachstum und Proliferation beteiligt (Gu et al., 2000). Für diese Gruppe sind die Struktur motive bHLH und PAS charakteristisch. In Abb.1.1 sind die funktionellen Domänen von AhR, ARNT und AhRR schematisch dargestellt.

Der AhR hebt sich innerhalb der bHLH/PAS Proteinfamilie durch eine Ligandenbin-
 dungsstelle heraus. Die bHLH-Bindedomäne ist für die Bindung an die DNA und für die
 Protein-Protein-Dimerisierungen verantwortlich. Die C-terminal zur bHLH-Struktur lie-
 gende PAS-Bindungsdomäne ist bei den Proteinen AhR und ARNT in zwei hydrophobe
 Untereinheiten A und B gegliedert. Die Untereinheit A ist für Bindungen mit anderen
 PAS-Proteinen verantwortlich, wo hingegen die B Untereinheit für die Liganden- und
 hsp90-Bindung nötig ist. Der AhRR besteht in der PAS-Domäne nur aus der Unter-
 einheit A und kann keinen Liganden binden. bHLH-Proteine können Homo- als auch
 Heterodimere ausbilden.

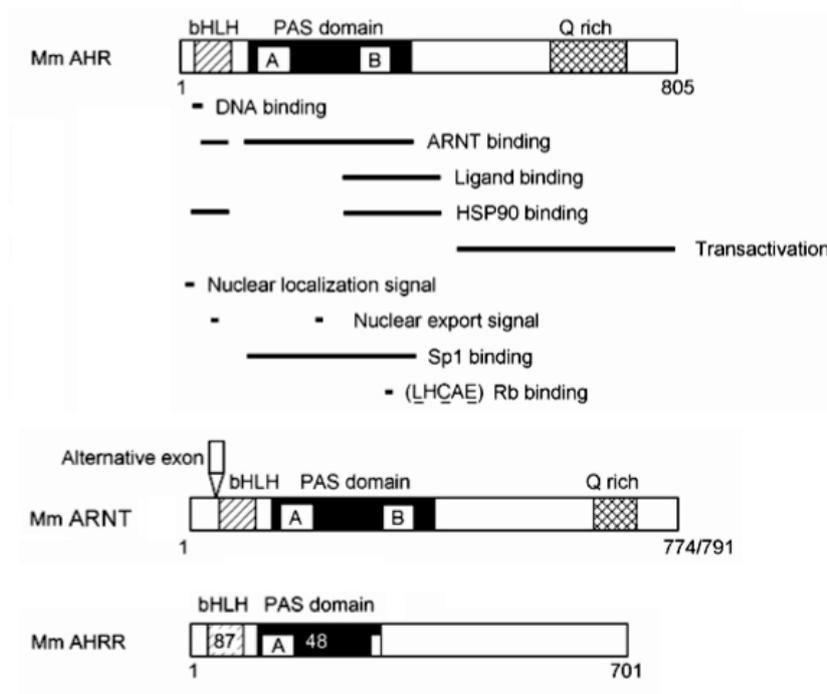


Abb. 1.1: Vergleichsschema der funktionellen Domänen von AhR, ARNT und AhRR.

Abgeändert nach Fujii-Kuriyama und Mimura (2003)

Nach einem Spacerbereich befindet sich N-terminal die Glutamin (Q) reiche Transaktivierungsdomäne. Diese Strukturdomäne ist unabdingbar für die Gentranskription. Der AhRR verfügt nicht über eine Transaktivierungsdomäne und verhindert durch Dimerisierung mit ARNT und Bindung an die konservierten XRE-DNA-Elemente, die Transkription AhR-abhängiger Gene. Der AhRR unterscheidet sich weiter vom AhR und ARNT über eine nicht vorhandene B-Untereinheit in der PAS-Domäne und eine nicht vorhandene Transaktivierungsdomäne.

Liganden des AhR

Der AhR bindet eine Vielzahl an Liganden unterschiedlichen Ursprungs und Struktur (Adachi et al., 2001, 2004; Bjeldanes et al., 1991; Denison und Nagy, 2003; Fujii-Kuriyama und Mimura, 2005; Heath-Pagliuso et al., 1998; Rannug et al., 1987). Liganden, die mit einer hohen Affinität an den AhR binden, haben ein planare Molekülstruktur. Dabei korreliert die Affinität positiv mit der Toxizität und der biologischen Potenz der Verbindung. Einige dieser Liganden sind repräsentativ für diese große Gruppe in Abb.1.2 dargestellt. Diese Stoffe sind anthropogene, biogener, wie auch endogener Herkunft.

Sehr ausgiebig charakterisierte Liganden sind industriell unerwünscht erzeugte halogenierte aromatische Hydrokarbone (HAHs) und polyzyklische aromatische Hydrokarbone (PAHs). Diese entstehen bei der Pyrolyse von organischen Verbindungen in Gegenwart von organischen oder anorganischen Halogen-Verbindungen. Die Nebenprodukte entstehen bei der industriellen Produktion von zahlreichen Chemikalien, wie etwa Herbiziden (2,4,5 Trichlorphenoxyessigsäure), bei der Herstellung von Chlorphenolen, bei der Bleichung mit Chlor in der Papierherstellung und bei metallurgischen Prozessen.

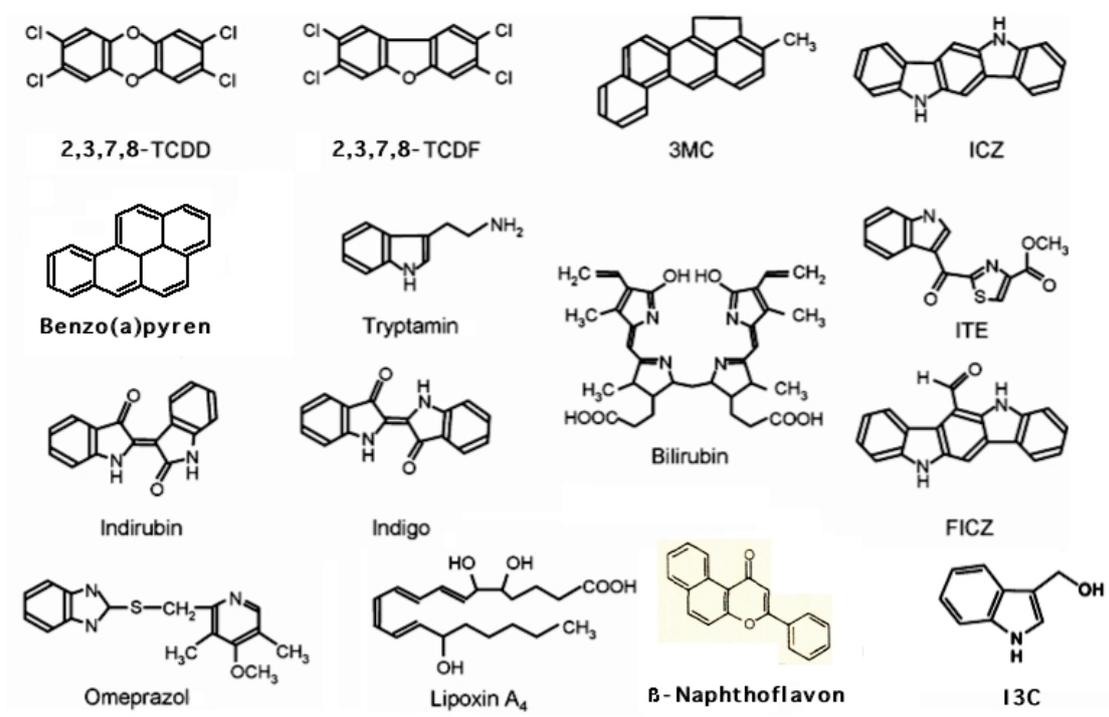


Abb. 1.2: Chemische Struktur einiger AhR-Liganden.

Abgeändert nach Fujii-Kuriyama und Mimura (2005). TCDD: 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin, TCDF: 2,3,7,8-Tetrachlordibenzofuran, 3MC: 3-Methylcholanthren, ICZ: Indol-[3,2-*b*]carbazol, ITE: 2-(1'*H*-indol-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylsäuremethylester, FICZ: 6-Formylindolo[3,2-*b*]carbazol, I3C: Indol-3-carbinol

Halogenierte aromatische Hydrokarbone

Die metabolisch stabileren HAHs binden mit einer höheren Bindungsaffinität im Bereich von 10⁻¹² bis 10⁻⁹ Molar an den AhR gegenüber den instabileren PAHs mit einer Affinität im Bereich von 10⁻⁹ bis 10⁻⁶ Molar (Denison und Nagy, 2003). Der prominenteste Vertreter der Gruppe der HAHs ist TCDD. TCDD gehört zur Gruppe der polyhalogenierten Dibenzo-*p*-dioxine (PCDD) und hat die höchste Toxizität der 75 Chlor-Kongenerne. PCDDs entstehen während bei der industriellen Herstellung von chlorhaltigen aromatischen Verbindungen, oder bei der anorganischen und organischen Pyrolyse von chlorhaltigen Verbindungen. TCDD ist sehr lipophil und persistent und reichert sich sehr schnell in fetthaltigen Matrices an. TCDD ist plazentagängig und es bestehen große Speziesunterschiede bezüglich der Organverteilung. Diese großen Speziesunterschiede bestehen auch bezüglich der akuten Toxizität von TCDD. Allein bei

Nagetieren unterscheidet sich die akute Toxizität von TCDD zwischen Meerschweinchen (LD_{50} 1 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) und Hamster (LD_{50} 5000 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) um mehr als drei Zehnerpotenzen (Poland und Knutson, 1982). In die öffentliche Debatte ist TCDD durch mehrere Störfälle in Chemikalienwerken (Seveso, Carrara, Duisburg) oder der Akkumulation in der Nahrungskette (Mutter- und Kuhmilch, Gemüse, Eier) geraten. Sehr gut beschrieben sind die ligandeninduzierten Effekte des AhR ausgelöst durch TCDD, wie Teratogenese, Tumorpromotion, Thymusatrophie, epitheliale Hyperplasie und Hepatoxizität (Poland und Knutson, 1982).

Polyzyklische aromatische Hydrokarbone

PAHs, wie z.B. B[a]P und 3MC (Abb.1.2) binden an den AhR und initiieren die Transkription von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen. Diese Enzyme der Phase I und II des Fremdstoffmetabolismus katalysieren die Degradierung der PAHs. Bei der Reaktion mit CYP450-abhängigen Monooxygenasen kann es zur Bildung von reaktiven Diolepoxiden kommen, welche mit Proteinen und der DNA Addukte bilden und die Entstehung von Krebs initiieren können.

Biogene Liganden

Neben den genannten anthropologischen Liganden, sind einige natürliche Liganden biogener Herkunft bekannt. Diese Pflanzeninhaltsstoffe werden über die Nahrung aufgenommen. Zu diesen gehören vor allem die große Gruppe der Flavonoide und deren Metabolite (z.B. I3C, ICZ) wie auch Tryptophanderivate (Abb.1.2). So werden Indole säurekatalysiert im Gastrointestinaltrakt zu affinen Liganden katalysiert. Einige dieser Stoffe wirken agonistisch und andere antagonistisch auf den AhR-Signalweg (Denison und Nagy, 2003).

Endogene Liganden

Die Existenz eines endogenen Liganden wird unter anderem in physiologisch adverse Effekten AhR-defizienter Mäuse begründet (Fernandez-Salguero et al., 1997; Mimura et al., 1997; Schmidt et al., 1996). Unterstützt wird dies durch mehrere Studien in denen der AhR aktiv in Abwesenheit eines exogenen Liganden ist (Referenzen in Denison und Nagy (2003)). Eine Vielzahl von AhR-Liganden resultiert aus biologischen und physikochemischen Prozessen mit der für den Menschen essentiellen Aminosäure Tryptophan (Abb.1.3) (Denison und Nagy, 2003; Heath-Pagliuso et al., 1998).

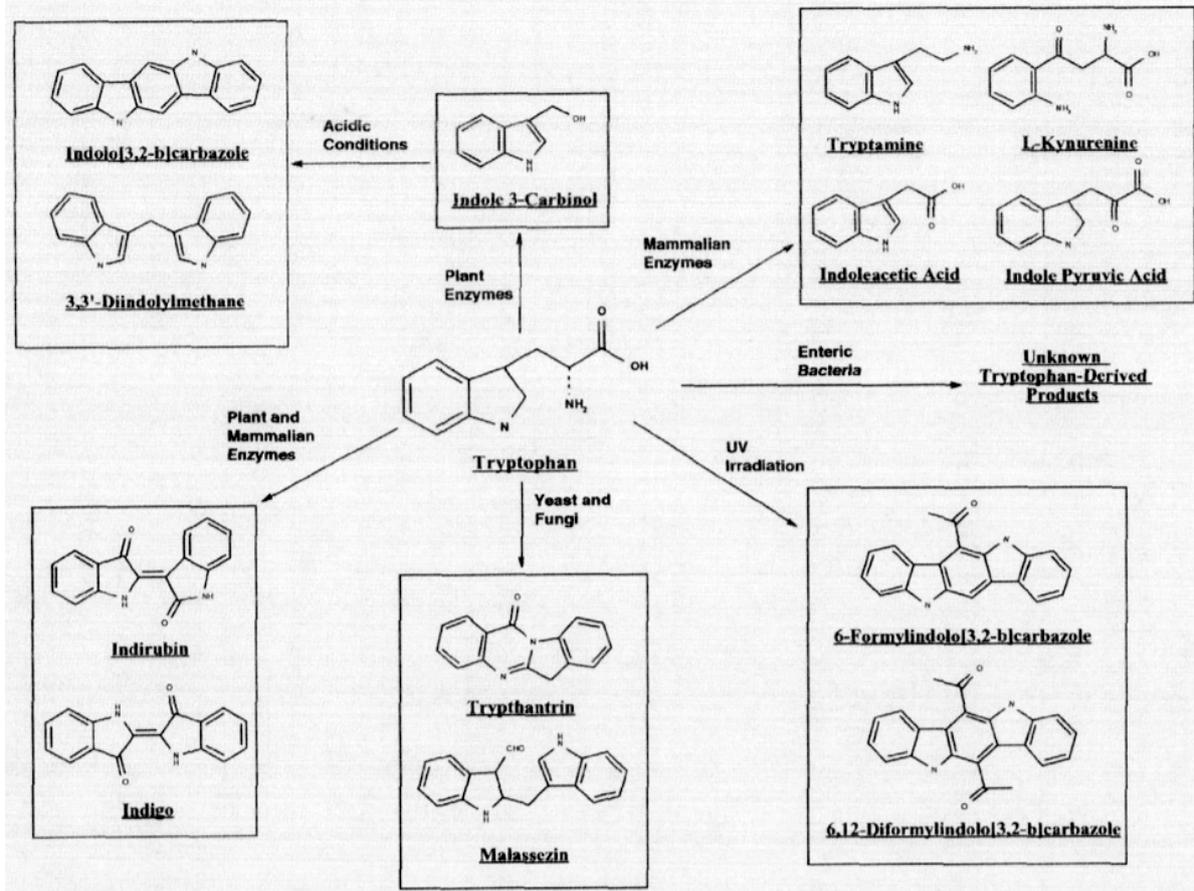


Abb. 1.3: Bildung von aktiven von AhR-Liganden ausgehend von biologischen und physikochemischen Prozessen mit Tryptophan.
 Nach Denison und Nagy (2003).

Frühe Studien von Goertz et al. (1996) wiesen bereits auf einen Zusammenhang von UV-Bestrahlung mit dem AhR durch CYP1A1 Induktion in Haut und Leber hin. So konnte im zellfreiem System (Öberg et al., 2005; Rannug et al., 1987) und auch *in vitro* (Fritsche et al., 2007) die Entstehung des Tryptophan Photoproductes FICZ (6-Formylindolo[3,2-b]carbazol, Abb.1.2, 1.3) durch UV-Bestrahlung nachgewiesen werden. Andere Tryptophanmetabolite die als AhR-Liganden wirken sind Indole und Tryptamine (Bjeldanes et al., 1991; Denison und Nagy, 2003), wie auch im menschlichen Urin nachgewiesene Indigo und Indirubin (Abb.1.2, 1.3) (Adachi et al., 2001, 2004).

AhR-Signalweg assoziierte Proteine

AhR Nuclear Translokator

Der irrtümlicherweise als AhR-Nuclear-Translokator bezeichnete Bindungspartner des AhR ist nur nukleär lokalisiert und nicht an der Internalisierung des AhR beteiligt. ARNT fungiert für eine Reihe von bHLH-PAS Transkriptionsfaktoren als gemeinsamer Dimerisierungspartner (Gu et al., 2000). Diese bHLH-Dimer bindet an konservierte E-box DNA-Motive, welche in der Enhancer Region von induzierbaren Genen liegen.

Neben dem AhR ist der Hypoxie induzierbare Faktor 1 alpha (Hif-1 α) ein wichtiger und bekannter Partner des ARNT. Unter Hypoxie reguliert Hif-1 α u.a. über die Expression des Vaskuläre-Endothel-Wachstumsfaktor (VEGF) die Angiogenese und über die Expression von Erythropoietin (EPO) die Erythrozytenproduktion.

ARNT wird bereits früh während der embryonalen Entwicklung der Maus exprimiert (Abbott und Probst, 1995). Eine Regulation der Expression durch exogene Stoffe ist nicht bekannt und ARNT wird in allen Zellen konstitutiv exprimiert. Für ARNT homozygot defiziente Mäuse sind nicht lebensfähig. Aufgrund einer fehlenden Vaskularisierung versterben diese früh in der embryonalen Entwicklung zwischen Tag 9,5 und 10,5 nach Befruchtung (Kozak et al., 1997).

Arylhydrokarbon-Rezeptor-Repressor

Der AhRR wurde erstmals von (Mimura et al., 1999) beschrieben und gehört neben AhR und ARNT der bHLH/PAS-Proteinfamilie an (Gu et al., 2000; Taylor und Zhulin, 1999) (siehe 1.1.1). Der AhRR dimerisiert mit ARNT und bindet an XRE-DNA-Motive, ist aber aufgrund einer fehlenden Transaktivierungsdomäne transkriptionell inaktiv und reprimiert die Expression dieser Gene. Transiente Genüberexpressionsstudien in Zellkultur weisen auf eine negative Rückkopplungsregulation des AhRR auf die Transkription AhR-abhängigen Gene hin (Baba et al., 2001; Evans et al., 2005; Karchner et al., 2002; Mimura et al., 1999).

Dennoch ist die physiologische Funktion des AhRR noch unklar. Der *AhRR* wird ubiquitär in Organismen exprimiert und die Expression wurde bereits in unterschiedlichen Vertebraten untersucht (Fujita et al., 2002; Karchner et al., 2002; Korkalainen et al., 2004; Mimura et al., 1999; Nishihashi et al., 2006; Tsuchiya et al., 2003; Yamamoto et al., 2004). Die Kontrolle der AhRR-Expression wird durch drei funktionelle XREs, drei GC-Elemente, sowie eine NF κ B-Bindungsstelle in der 5'-flankierenden Promoterregion des *AhRR* beeinflusst (Baba et al., 2001).

Aktivierung des AhR-Signalweges durch AhR-Liganden

Im inaktiven Zustand ist der AhR im Zytosol als Multi-Protein-Komplex lokalisiert. Dieser Komplex besteht aus zwei Heath-Shock-Chaparone hsp90 (Perdew, 1988), einem Co-Chaperon p23 (Kazlauskas et al., 1999), einem Immunophilin-ähnlichen Protein AIP (auch als XAP2 bezeichnet) (Petrulis et al., 2003) und der assoziierten Tyrosin-Kinase c-Src (Enan und Matsumura, 1996). Die hsp90 Proteine halten den Rezeptor in eine offene Konformation für die Ligandenbindung und werden durch die Interaktion mit p23 stabilisiert. AIP ist gemeinsam mit p23 an der zytosolischen Lokalisation des AhR beteiligt (Kazlauskas et al., 2000). AIP blockiert die Bindung von Importin β und hält den Komplex im Zytosol arretiert (Petrulis et al., 2003).

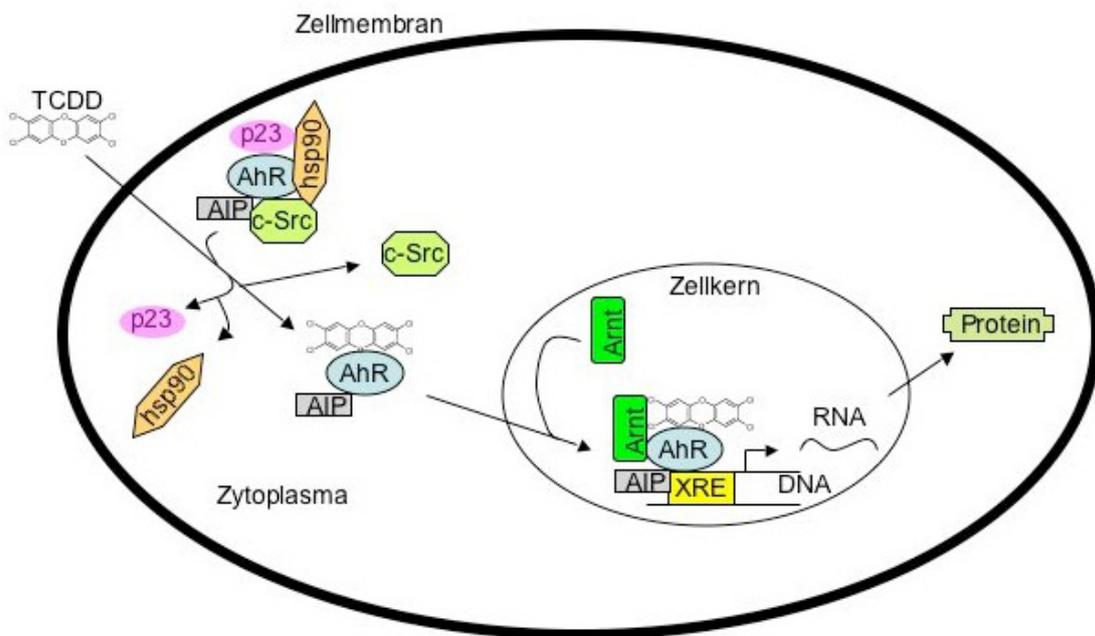


Abb. 1.4: Schema der Aktivierung der AhR-abhängigen Genregulation am Beispiel TCDD.

Der AhR liegt inaktiv als Multi-Protein-Komplex bestehend aus hsp90, p23, AIP und c-Src im Zytoplasma vor. Nach Penetration des Liganden TCDD bindet dieser an den AhR und der Komplex zerfällt. Im Zellkern dimerisiert der AhR mit ARNT, bindet an die XRE der DNA und initiiert die Transkription von AhR-abhängigen Genen.

Die Aktivierung des AhR-Signalweges erfolgt nach Penetration des hydrophoben Liganden in die Zelle und dessen Bindung an die Ligandenbindungsstelle des AhR. Durch die Konformationsänderung dissoziiert der AhR-Komplex. Dabei wird die NLS-Sequenz des AhR zugänglich für Importin β und der AhR transloziert in den Nukleus. Dort dimerisiert der AhR mit seinem Bindungspartner ARNT (Mimura und Fujii-Kuriyama, 2003). Der bHLH Dimer bindet an konservierte DNA-Motive, als Xenobiotika Responsive Elemente (XRE) bezeichnete Schema mit der Kernsequenz 5'-TNGCGTG-3'. Diese liegen in der Enhancer Region von AhR-induzierbaren Genen (Denison et al., 1988). Interaktionen zwischen dem AhR-ARNT-Komplex und der DNA führen zu einer Enhancer-Promoter Kommunikation, einer resultierenden veränderten Chromatinstruktur, zur Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren und Induzierung der Gentranskription (Ko et al., 1996). Der AhR wird über eine nukleäre Exportsequenz (NES) in das Zytoplasma überführt und dort Ubiquitin-abhängig im Proteasom degradiert (Ma und Baldwin, 2000).

Zielgene des AhR

Die Xenobiotika begründete Expression von AhR-responsiven Genen wurde ausgiebig an dem Cytochrome *P4501A1* (*CYP1A1*) als AhR-vermitteltes Model-Gen erforscht (Whitlock Jr., 1999). Weitere gut untersuchte AhR-abhängige Gene sind Cytochrome *P4501A2* (*CYP1A2*), Cytochrome *P4501B1* (*CYP1B1*) (Abel et al., 1996; Murray et al., 2001), *NAD(P)H-Chinone-Oxidoreduktase* (*Nqo*) (Döhr et al., 1995), *AhR-Repressor* (*AhRR*) (Mimura et al., 1999), *UDP-Glucuronosyl-Transferase* (*UGT*) (Zhou et al., 2005) und *Aldehyd-Dehydrogenase-3* (*ALDH3*) (Boesch et al., 1999). Des Weiteren sei auf Bock und Koehle (2006) verwiesen. All diesen Genen ist ihre adaptive Funktion der Metabolisierung von Xenobiotika gemeinsam.

Genregulation via AhR ist ein sehr komplexer Prozeß, dessen Ausmaß und Zellspezifität durch eine Vielzahl an Faktoren kontrolliert wird. Zu diesen Faktoren gehören transkriptionelle Co-Faktoren, die Art des Liganden, die Blockierung des Promoters durch Repressoren, die Verfügbarkeit von ARNT, usw. (Hankinson, 2005; Ko et al., 1996; Kobayashi et al., 1996).

1.1.2 Rolle des AhR bei Zellwachstum und Zelldifferenzierung

Neben der adaptiven Funktion in Phase I und II des Fremdstoffmetabolismus, spielt der AhR eine physiologische Rolle in der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung (Elferink, 2003; Nebert et al., 2000). Die physiologische und entwicklungspezifische Rolle des AhR wurde durch drei unabhängig generierte AhR-defiziente Mäusestämme untersucht (Fernandez-Salguero et al., 1997; Mimura et al., 1997; Schmidt et al., 1996).

AhR-defiziente Mäuse weisen ein niedrigeres relatives Lebergewicht und eine höhere Apoptoserate der Parenchymzellen auf. Ferner zeigen sich phänotypisch kardiovaskuläre Veränderungen, vaskuläre Hypertrophie in der Leber und dem Uterus. Zusätzlich weisen sie T-Zell Mangel in der Milz, aber nicht in anderen lymphatischen Organen, Immunsystemdefizienz, interfollikuläre und follikulär epidermale Hyperplasien, mit Hyperkeratose und Akanthose der dorsalen Haut auf (Fernandez-Salguero et al., 1997; Lahvis et al., 2000; Mimura et al., 1997; Schmidt et al., 1996).

Vergleichbar zu adversen Effekten von AhR-defizienten Mäusen, führte eine Mutation in der Kernlokalisationssequenz zu adäquater Entwicklungsstörung in der Leber (Bunger et al., 2003). Diese Mäuse weisen ein geringeres relatives Lebergewicht gegenüber Wildtyp Tieren auf. Ferner ist der Ductus venosus ähnlich wie bei AhR-defizienten Tieren nach der Geburt nicht geschlossen. Dies führt dazu, daß der Leberkreislauf umgangen wird und das Blut von der Pfortader direkt in die Hohlvene gelangt. Es kommt zu keiner Entgiftung von Schadstoffen durch die Leber.

Kontrastierend zur AhR-defizienten und -mutierten Maus präsentiert die CA-AhR-Maus einen konstitutiv aktiven AhR. Dieses transkribierte AhR-Konstrukt verfügt nicht über die Nukleäre-Export-Signal (NES) Sequenz. Diese Mäuse versterben sehr früh an malignen Magenkarzinomen, haben ein geringeres Thymusgewicht und ein höheres Lebergewicht (Andersson et al., 2002). Die Überexpression des AhR in transfizierten neuronalen Neuro2a-R α -Zellen (ATCC) resultiert in einer gestörten neuronalen Entwicklung (Akahoshi et al., 2006). Neuro2a-R α -Zellen sind murine Neuroblastomazellen, die häufig für Studien der Neurogenese verwendet werden. Die gestörte neuronale Entwicklung resultiert in einer morphologisch erkennbaren spontanen Veränderung zu Nervenentzündungen mit axonähnlichen Strukturen. Zusätzlich exprimieren diese Zellen Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA, einem funktionellen Marker für die Produktion des Neurotransmitter Catecholamin.

In *Caenorhabditis elegans* ist der AhR gemeinsam mit ARNT an der Regulation der neuronalen Entwicklung beteiligt (Qin und Powell-Coffman, 2004). Es konnte gezeigt werden, daß die AhR und ARNT *C. elegans* Orthologa an der Migration und Differenzierung von AVM und SDQR Neuronen beteiligt sind. Die gemeinsame Beteiligung der Protagonisten an der Organdifferenzierung wurde durch Studien an AhR- und ARNT-hypomorphen Allelen bestätigt (Walisser et al., 2004).

Diese Ergebnisse evozieren einen starken Einfluß des AhR auf die Entwicklung. Immunhistochemische Analysen zeigten, daß der AhR in Regionen des sich verändernden embryonalen Gewebes der Maus exprimiert wird (Abbott et al., 1995). Der früheste beschriebene Zeitpunkt der AhR-Expression ist das Acht-Zell-Stadium in der Blastozystenphase des murine preimplantierten Embryos (Peters und Wiley, 1995). Studien mit AhR-Antisense Oligodeoxynukleotide zeigten eine Hemmung der Differenzierung und Zellproliferation (Peters und Wiley, 1995).

1.1.3 Einfluß des AhR auf die Zellregulation

Der AhR beeinflusst den Zellzyklus direkt durch die Induktion des Zyklin/cdk-Inhibitors p27 (kip1) (Ge und Elferink, 1998). In Zelllinien, in denen der AhR deletiert oder mutiert ist, weisen ein niedrigere Wachstumsrate gegenüber dem Wildtyp auf (Elizondo et al., 2000; Ma und Whitlock Jr., 1996). AhR-defiziente murine embryonale Fibroblasten (MEF) arretieren in der G₂/M-Phase (Elizondo et al., 2000).

Die direkte oder indirekte Modulation der Zellregulation durch Einflußnahme des AhR, auf andere Transkriptionsfaktoren (Ge und Elferink, 1998), auf Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren (Nguyen et al., 1999; Wang und Hankinson, 2002) und der Veränderung von Signal-Transduktionskaskaden (Carlson und Perdew, 2002; Döhr et al., 1994; Tan et al., 2004) wurde in zahlreichen Studien in den letzten zehn Jahren deutlich. Zusammen suggerieren diese Studien eine Involvierung des AhR an der Zellzyklusregulation in Abwesenheit eines exogenen Liganden (Elferink, 2003). Die Anwesenheit eines exogenen Liganden und die Adaptation an diesen, könnte dabei die Homöostase der Regulationen, an denen der AhR beteiligt ist, stören. Diese Interpretation spiegelt sich in zahlreichen Studien wieder, in denen es in Anwesenheit eines AhR-Liganden zu Entwicklungsstörungen kommt (Abbott et al., 1998; Vogel et al., 1997, u.a.).

1.2 Die Leber

1.2.1 Funktion

Die Leber erfüllt zahlreiche wichtige Funktionen im Stoffwechsel des Gesamtorganismus. Neben der Milz als Blutfilter zwischen Darm und dem Rest des Organismus gelegen, sorgt es für eine konstanten Aminosäure- und Glucosespiegel, für die Synthese und Kontrolle der Blutplasmaproteine und für die Synthese von Kreatin, Harnstoff und Harnsäure (Schwarz, 2005). Der Bluteinstrom in die Leber erfolgt über die *Vena portae* aus dem Darm und den umliegenden Organen, sowie über die *Aorta hepatica*. Via *Vena hepatica* erfolgt der Blutausstrom in die *Vena cava inferior*.

Als größte Anhangsdrüse des Darms, sekretiert die Leber kontinuierlich Galle in das Reservoir Gallenblase und ist entscheidend an der Emulgierung von Fetten in der Nahrung verantwortlich (Cleffmann, 1987). Die Abbauprodukte des Porphyrins (Bilirubin, Biliverdin) und weitere Metabolite des hepatischen Kreislaufs werden billiär in das Duodenum abgegeben und letztendlich ausgeschieden. Bei der Metabolisierung von Endo-, wie Exogenen Substanzen spielen hepatische Enzyme eine wichtige Schlüsselfunktion. Durch die Hydroxylierung, etwa von Medikamenten, Abbauprodukten und Giftstoffen, durch Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen, werden diese Stoffe polarer und nach anschließender Konjugationsreaktion mit Transportmolekülen ausgeschieden.

Metabolismus

Bei der Metabolisierung endo- und exogener Substanzen wird die physikochemische Eigenschaft dieser, mit einer resultierenden Veränderung ihrer biologischen Aktivität, zu polaren und wasserlöslichen Produkten modifiziert. Die Metabolisierung wird in zwei Phasen unterteilt.

Zu den Leitenzymen der Phase I im zellulären Stoffwechsel gehören die CYP450-abhängigen Monooxygenasen. Die Expression einiger Isoformen der CYP450-abhängigen Monooxygenasen werden durch den Arylhydrokarbon-Rezeptor induziert und sollen kurz allgemein beschrieben werden.

Die CYP450-abhängigen Monooxygenasen sind in den Mitochondrien und in ihrer Mehrheit in der Membran des glatten endoplasmatischen Retikulums (ER) eingebettet. Als Hämoprotein besitzt das CYP450 ein Häm in Form eines Fe-Protoporphyrins, welches nicht-kovalent an das Apoprotein gebunden ist. Das CYP450-System benötigt

das Reduktionsäquivalent Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat NADPH, welches durch die NADPH-P450-Reduktase vermittelt wird. Dieses System katalysiert in Gegenwart von Sauerstoff die Hydroxylierung eines endogenen oder exogenen Substrats. Dabei wird ein Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen und das zweite Sauerstoffatom mittels NADPH zu Wasser reduziert. Aufgrund der Doppelfunktion, Oxidation des Substrates einerseits und Reduktion des Wassers andererseits, werden die CYP450-Monooxygenasen auch als mischfunktionelle Oxygenasen (MFO) bezeichnet. Eine wichtige Differenzierung der CYP450-Familien ergibt sich aus der Induzierbarkeit der unterschiedlichen Isoformen durch Xenobiotika. Weitere Enzyme der Phase I sind flavinabhängige Monooxygenasen (FMO) und Monoaminoxidase (MAO).

In der Phase II werden die polaren Substanzen mit endogenen Molekülen durch gleichnamige Transferasen konjugiert. Zu diesen gehören unter anderem die Glutathion-S-Transferase, UDP-Glucuronosyltransferasen, Sulfotransferasen, Acetyltransferasen und Methyltransferasen.

1.2.2 Aufbau

Äußerlich läßt sich die Leber in Lappen (Lobus) unterteilen, deren Anzahl und Größe speziesspezifisch sind (Deschel, 2005). Der Aufbau der Leber ist morphologisch, wie funktionell zu unterscheiden.

Lobuli

Die morphologische Baueinheit ist das Lobuli (Leberläppchen; siehe Abb.1.5). Im Querschnitt hexagonal, treffen an den Ecken drei Lobuli an dem periportalen Feld (PF) zusammen. Das periportal Feld repräsentiert die Äste der Leberarterie (*A. hepatica*) und der Pfortader (*V. portae*) sowie einen Gallengang. Zentral eines jeden Lobuli liegt die Zentralvene (ZV), auf die radiär die Hepatozyten als Platten (Muralium; LB) und dazwischen liegende Sinusoide (Leberkapillare; S) zu laufen (Deschel, 2005).

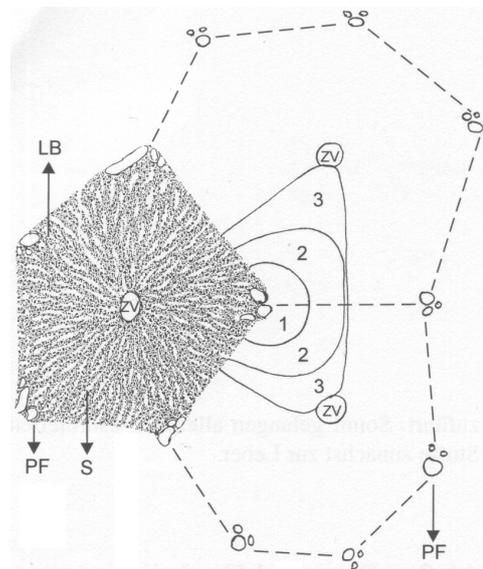


Abb. 1.5: Feinbau der Leber

Beschreibung im Text erläutert.
Abgeändert nach Greim, 1996,
Anmerkung: sechste Ecke eines
Lobus ausgeschnitten

Acinus

Der Acinus stellt die funktionelle Einheit der Leber dar und umfaßt drei benachbarte Leberläppchen (Abb.1.5) mit dem zentralliegenden periportalen Feld. Mit zunehmender Entfernung vom periportalen Feld zur Zentralvene nimmt die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Blutes ab. Es werden drei zirkulatorische Versorgungszonen unterschieden. Zone 1, das periportale Feld, die intermediäre Zone 2, und die perivenöse Zone 3 (Schwarz, 2005).

Dieser Versorgungsgradient führt zu einer metabolischen Zonierung des Leberparenchyms. Periportal sind Sulfotransferasen und GSH-Peroxidasen, und perivenös sind Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen, Epoxidhydrolasen, Glutathion-S-Transferase und UDP-Glucuronosyltransferasen lokalisiert. In dieser metabolischen Zonierung sind einige substanzabhängige zonale Leberschädigungen begründet (Schwarz, 2005).

1.2.3 Hepatozyt

Der prinzipiell funktionelle Zelltyp der Leber ist der Hepatozyt, mit einem parenchymalen Anteil von 70% und einem Zellvolumenanteil von 80% (Deschel, 2005). Hepatozyten sind polygonal, plasmareich sowie polyploid und teils mehrkernig (Deschel, 2005). Es sind polarisierte Epithelzellen mit endokrinen und exokrinen Anteilen. Biliäre Epithelzellen, sinusoidale Endothelzellen, Ito-Zellen und Kupferzellen repräsentieren den Hauptteil an nicht-hepatozytischen Zellen in der Leber (Zhao und Duncan, 2005). Diese stehen nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell sehr eng mit den Hepatozyten in Wechselwirkung (Deschel, 2005). Kupferzellen etwa, leberspezifische Makrophagen, dienen der Immunabwehr und phagozitieren Bakterien oder Zellbestandteile. Darüber hinaus können Kupferzellen und Endothelzellen über die Sekretion von biologisch aktiven Stoffen, wie etwa Eicosanoide oder Zytokinen (hepatozyten growth factor, transforming growth factor- α/β) auf den Hepatozyten Einfluß nehmen (Schwarz, 2005).

Intrazellulär weisen Hepatozyten eine sehr große Anzahl an Mitochondrien, Lysosomen und Peroxisomen auf. Diese große Menge an Organellen, in denen fremdstoffmetabolisierende Enzyme lokalisiert sind, und das stark ausgeprägte glatte ER spiegeln die metabolische Funktion der Hepatozyten wieder. Die hohe Synthesekapazität der Hepatozyten wird durch ein deutlich präsenes rauhes ER charakterisiert.

1.2.4 Kultivierung von Leberzellen

Für *in vitro*-Analysen der Leber sind unterschiedliche Ansätze bekannt. Je nach Fragestellung können einfache oder komplexere Systeme herangezogen werden. Die Mikrosomenfraktion stellt das einfachste System dar. Die durch differentielle Ultrazentrifugation aus Leberhomogenat erhaltene Zellfraktion, ist das funktionelle Abbild der membranständigen Enzyme. Ein komplexeres System stellen Leberschnitte aus frischem Gewebe dar. Diese stellen zum Zeitpunkt der Resektion den gesamten Zellverband, in seiner funktionellen Heterogenität und Differenzierung, einschließlich der Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktion, dar. Neben einer guten Korrelation der metabolischen Aktivität zur *in vivo*-Situation, verfügen Leberschnitte über aktive Stofftransportmechanismen. Durch die limitierte Inkubationszeit von 24 Stunden, sind Leberschnitte nicht für jede Fragestellung das geeignete System. Ein weiterer Ansatz ist die Leberzellkultur.

Die Verwendung von Leberzellkulturen hat einen mannigfaltigen Hintergrund. Neben der Möglichkeit der längeren Kultivierung, kann das gesamte Spektrum der hepatischen Enzyme erhalten bleiben. Des Weiteren ist unter bestimmten Umständen die Differenzierung der Zellen möglich. Es werden für *in vitro*-Untersuchungen der Zellbiologie, des Arzneimittel-Metabolismus, der Hormonwirkung, der Karzinogenese, des Fettstoffwechsels und des Fremdstoffmetabolismus Leberzellkulturen herangezogen.

Die Prüfung am Tier hat, je nach Fragestellung, aufgrund des Blutkreislaufsystem, des Hormonstatus oder durch das Nervensystem, oft Nachteile vorzuweisen. Neben tierschutzrechtlichen und ethischen Gründen hat die Verwendung von *in vitro*-Systemen vielfältige Vorteile:

- eine Harmonisierung der Bedingungen, physikalisch wie chemisch
- gezielte Einflußnahme auf das System mit Noxen
- eine exakte Dosierung der verwendeten Noxen
- eine genaue zeitliche Exposition des Systems
- weniger kosten- und arbeitsintensiv
- und eine geringere Ausgangsmengen der Noxen sind nötig.

Die Kultivierung von Leberzellen außerhalb ihrer physiologischen Umgebung, dem Organ Leber und dem lebenden Organismus als solchem, erfordert die Simulation einer *in vivo*-Situation. Supplemente im Kulturmedium können einer Aufrechterhaltung der spezifischen Funktion von Zellen dienen. Verwendung extrazellulärer Matrixproteine erweitern die Kultivierung in Richtung einer *in vivo*-Situation. Die Kulturschale als statisches Zellsystem als solches, unterliegt dabei Beschränkungen, wie etwa durch die Anreicherung an Metaboliten.

Die Verwendung permanenter hepatischer Zelllinien, wie z.B. der humanen Hepatomakarzinomazelllinie Hep-G2, ist unproblematisch, weißt jedoch eine mangelnde komplexe metabolische Aktivität und Kapazität auf (Wilkening et al., 2003). Die Kultivierung primärer Zellen ist oftmals sehr schwierig, diese verfügen gegenüber immortalisierten Zellen über ein breites metabolisches Spektrum. Mischpopulationen in primären Kulturen spiegeln den heterogenen Zellverband *in vivo* stärker wieder.

Um *in vitro*-Untersuchungen nahe am *in vivo*-System durchzuführen, ist die Nutzung primärer Zellen unumgänglich. Für die Gewinnung von primären Leberzellen können adulte, wie fötale Lebern herangezogen werden. Nicht-proliferierende, differenzierte Zellen werden von adulten Tieren und proliferierende, undifferenzierte Zellen können von Feten erhalten werden.

1.3 Zielsetzung

Gegenstand dieser Arbeit ist eine nähere Aufklärung der Expression und Induktion AhR-regulierter Gene in Geweben der Maus. Diese Studien wurden unter dem besonderen Aspekt der Funktion des AhRR untersucht.

Speziell sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- In welchen Geweben der adulten Maus ist der *AhRR* exprimiert?
- Wie verhält sich die konstitutive und induzierbare Expression des *AhRR* zur Induktionsantwort der *CYP1A1*-Expression?
- Welche Bedeutung hat der AhR für die Regulation der Expression des *AhRR* *in vivo*?
- Ist der AhR und der AhRR in fötalen Geweben der Maus exprimiert und gibt es Hinweise auf eine gegenseitige Beeinflussung?
- Inwieweit beeinflussen AhR und AhR-abhängige Gene die Homöostase der Zellregulation in der Leber?

Zur Abklärung dieser Fragestellungen wurden Expressions-Analysen in adulten Tieren, in fötalen Lebern sowie an fötalen Leberzellen in Kultur durchgeführt. Insbesondere die *in vivo*-Ergebnisse sollen neue Erkenntnisse über die Funktion des AhRR liefern.

2 Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien besaßen analytischen Reinheitsgrad und wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Zur Sterilisation wurden diese über Dampfdrucksterilisation für 20 min bei 120 °C autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden sterilfiltriert. Alle Chemikalien, wenn nicht anders angegeben, wurden von Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Die für das Immunoblotting verwendeten Antikörper und deren Zweitantikörper, sowie die verwendeten Verdünnungen sind in Tabelle 2.3 aufgelistet. Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) geliefert. Die Sequenzen der Oligonukleotide und deren Annealingtemperaturen sind in der Tabelle 2.2 aufgeführt.

Soweit nicht anders vermerkt, wurde bei der Benutzung von Kits und Agentien verschiedener Hersteller grundsätzlich gemäß den beiliegenden Anleitungen verfahren. Allgemein molekularbiologische Methoden wurden nach (Ausubel, 1992) bzw. (Sambrook et al., 1989) durchgeführt.

2.1 Haltung und Behandlung von Mäusen

2.1.1 Versuchstierhaltung

Weibliche und männliche acht Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden vom Züchter Janvier (Le Genest St. Isle, Frankreich) geliefert. AhR^{-/-} (C57BL/6-Ahr^{tm1Bra}) Tiere aus dem Labor von Bradfield (Schmidt et al., 1996) wurden über Jackson Laboratories (USA) bezogen. Die Expansionszucht der verwendeten Mäuse erfolgte in der institutseigenen Tierversuchsanlage. Die Mäuse wurden in Filter-Top-Käfigen unter standardisierten Bedingungen für Temperatur (20 °C), Luftfeuchtigkeit (55 %) und einem 12h-Licht-12h-Dunkel-Rhythmus (Licht ab 6:00 Uhr) gehalten. Die Tiere erhielten Pellet-Nagerfutter (Ssniff, Soest) und Wasser (pH 3,5) *ad libitum*.

Für die Verpaarung von C57BL/6 Mäusen wurden Übernacht 3 weibliche Tiere zu einem männlichen Tier gesetzt. Am nächsten Morgen wurden die weiblichen Tiere nach positiver Plug-Kontrolle separiert. Dieser Zeitpunkt wurde als Tag 0,5 definiert.

2.1.2 Applikation von Substanzen und Organentnahme an Mäusen

In Studien mit B[a]P wurden die Tiere mit einer Dosis von 10 mg B[a]P pro kg bw i.p. behandelt. B[a]P wurde in DMSO und anschließend in Kornöl zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml eingestellt. Die Kontrolltiere erhielten das Lösungsmittel. Die Tiere wurden 24 h nach Behandlung durch Kombination von Rompun (2 % (v/v); BayerVital, Leverkusen; 0,04 mg/g bw) und Ketamin (10 % (v/v); WDT, Deutschland; 0,2 mg/g bw) i.p. oder nach CO₂ Asphyxiation anästhesiert. Nach vollständigem Reflexverlust wurden die Nager nach zervikaler Dislokation dekapitiert. Die Organe wurden über einen abdominalen Schnitt entfernt.

Für die Proteinanalyse wurden die Organe direkt in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C für die weitere Analyse aufbewahrt. Für die Isolation von RNA wurden die Organe unverzüglich in TriReagent aufgenommen.

Alle Tierexperimente wurden nach gängigen nationalen Tierschutzrechtlinien durchgeführt.

2.2 Kultivierung primärer fötaler muriner Leberzellen

Die Isolierung und die Kultivierung von primären, fötalen Leberzellen der Maus wurden im Rahmen dieser Arbeit etabliert und die Protokolle sind nachfolgend dargestellt.

Alle Arbeitsschritte wurden aus Gründen der Sterilität unter einer Sicherheitswerkbank nach DIN-Norm 12950 Klasse 2 (Laminare Luftumwälzung) praktiziert.

2.2.1 Entnahme von fötalen Leberanlagen

Für die Gewinnung von fötalen Leberanlagen wurden die trächtigen Tiere zu den entsprechenden Zeitpunkten wie beschrieben betäubt. Über einen abdominalen Schnitt wurde der Uterus entfernt und in eine Petrischale mit eiskaltem PBS überführt. Die Feten wurden aus dem Uterus präpariert, dekapitiert und die fötalen Leberanlagen wurden entnommen.

Für die Proteinanalyse wurden die Leberanlagen direkt in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C für die weitere Analyse aufbewahrt. Für die Kultivierung der fötalen Leberzellen wurden die Leberanlagen in Leberperfusionsmedium (Gibco, Karlsruhe) im Eisbad bzw. für die RNA-Isolation in TriReagent aufgenommen.

2.2.2 Isolation und Kultivierung der primären fötalen Leberzellen

Beschichtung der Zellkulturgefäße mit Kollagen

Für die Kultivierung der fötalen Leberzellen wurde eine extrazelluläre Matrix benötigt. Zellkulturgefäße wurden mit 20 μg Rattenschwanz-Kollagen Typ I (Gibco, Karlsruhe) pro cm^2 Oberfläche beschichtet. Es wurden 200 μg Rattenschwanz-Kollagen Typ I pro ml PBS gelöst, und für 1 h bei Raumtemperatur (RT) auf den geöffneten Zellkulturgefäßen belassen. Nach der Inkubation wurde die Lösung abgenommen und die Oberflächen der Zellkulturgefäße wurden 2 \times mit PBS gründlich gespült. Die Zellkulturgefäße wurden luftgetrocknet und konnten bis zu einer Woche gebrauchsfertig bei 4 °C gelagert werden.

Die Beschichtung von Objektträgern erfolgte durch anätzen der Glasoberfläche mit 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Rattenschwanz-Kollagen Typ I in 0,02 N Essigsäure wie beschrieben.

Isolation der primären fötalen Leberzellen

In Leberperfuptionsmedium (Gibco, Karlsruhe) aufgenommene fötale Lebern wurden mit einer Handpestille in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß im Eisbad homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat in 10 ml Leberverdau-Medium (Liver digest medium, Gibco, Karlsruhe) überführt. Der weitere Aufschluß erfolgte bei 37 °C für 10 min in einem Schüttelwasserbad (200 rpm). Die Zellsuspensionen wurden über eine 40 μm Nylonmembran separiert, und die Zellen bei 4 °C für 10 min bei 300 $\times g$ pelletiert. Abschließend wurden die Zellen 2 \times in PBS gewaschen und in Grundmedium resuspendiert.

Grundmedium:

Konzentration	Komponente
	Williams Medium E (Gibco, Karlsruhe)
10 % (v/v)	FCS
2 mM	L-Glutamin
1 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin

Kultivierung der primären fötalen Leberzellen

Es wurden 2×10^4 Zellen/cm² (siehe Tab.2.1) im Anheftungsmedium ausgesät. Für die bessere Anheftung der Zellen wurde dem Grundmedium zusätzlich Rattenschwanz-Kollagen Typ I (Gibco, Karlsruhe) zugefügt.

Anheftungsmedium:

Konzentration	Komponente
	Williams Medium E (Gibco, Karlsruhe)
10 % (v/v)	FCS
2 mM	L-Glutamin
1 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin
6,25 µg/ml	Rattenschwanz-Kollagen Typ I (Gibco, Karlsruhe)

Tab. 2.1: Eingesetzte Zellzahl der entsprechenden Zellkulturgefäße für 2×10^4 Zellen/cm²

Kulturgefäß	Oberfläche [cm ²]/Einheit	Anzahl Zellen/Einheit
4-Kammer-Glasträger	2,5	5×10^4
8-Kammer-Glasträger	1,25	$1,9 \times 10^4$
6-Kammer-Platte	10	$2,0 \times 10^5$
24-Kammer-Platte	2	$4,0 \times 10^4$
96-Kammer-Platte	0,3	$6,0 \times 10^3$
T-25 Flaschen	25	$5,0 \times 10^5$
T-75 Flaschen	75	15×10^5

Nach einer Inkubation von 4,5 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit $200 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ Kulturmedium versorgt. Nach 24 h wurden $100 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ Kulturmedium zugeben. Der Mediumwechsel erfolgte im Abstand von 48 h nach Einsaat. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen von 37 °C in gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert.

Kulturmedium:

Konzentration	Komponente
	Williams Medium E (Gibco, Karlsruhe)
10 % (v/v)	FCS
2 mM	L-Glutamin
1 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin
4 ng/ml	rekombinanten HGF
20 ng/ml	rekombinanten mEGF
10 μ g/ml	Transferrin
40 nM	Na-Selenit
0,1 μ M	Dexamethason
50 mM	D-Valine

Die Synchronisation der Zellen erfolgte in serum- und supplementfreiem Medium. Die Zellen wurden für 24 h in verarmtem Medium vor weiteren Behandlungen kultiviert. Die Belastung der Zellen erfolgt mit 10 nM TCDD gelöst in 0,01 % (v/v) DMSO und mit 10 μ M B[a]P gelöst in 0,1 % (v/v) Tetrahydrofuran (THF). Die Kontrollgruppe wurde mit dem Lösungsmittel behandelt. Nach entsprechenden Zeitvorgaben wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen.

2.2.3 Allgemeine Zellkulturmethoden

Mikroskopische Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Die Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung erfolgte in einem Neubauer-Hämozytometer mittels Trypanblau-Ausschlußtest. Dazu wurden 10 μ l einer 10 ml Zellsuspension mit 10 μ l Trypanblau (0,5 %, Serva, Heidelberg) auf ein Volumen von 50 μ l mit PBS versetzt. Trypanblau wird nur von nicht intakten Zellen aufgenommen, die unter dem Mikroskop tiefblau erscheinen.

Die Zellzahl bezogen auf einen Milliliter errechnet sich aus der Anzahl der lebenden Zellen der Quersumme der 4 Großquadrate multipliziert mit dem Faktor 10^4 und dem Verdünnungsfaktor.

Passagieren von Zellen

Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit ausreichend PBS gründlich gewaschen. Um die adhärenen Zellen von der Matrix und der Kulturflasche zu lösen wurde 3 ml Accutase (PAA, Cölbe) auf die Zellen gegeben. Die vollständige Ablösung erfolgte nach einer geringen Zeit im Zellkulturinkubator und wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Zellen wurden in dem Grundmedium aufgenommen und durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette vereinzelt. Nach Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung wurden die Zellen rekultiviert.

2.2.4 Bestimmung der DNA-Synthese

Die Bestimmung der DNA-Synthese (Proliferation) erfolgte nach Herstellerangaben mit dem 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III von Roche (Mannheim). Das Prinzip beruht auf der kompetitiven Inkorporation des Thymidin-Analogons 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) in die DNA während der S-Phase des Zellzyklus. Die Zellen wurden für 2 h mit 10 μM BrdU behandelt, nachfolgend fixiert, mit Nuklease und mit einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper gegen BrdU inkubiert. Die Menge an eingebautem BrdU wurde durch den Peroxidase katalysierten Farbumschlag des Substrats ABTS (Roche, Mannheim) nach hellgrün bestimmt. Die Absorption wurde bei 405 nm im Kammernplattenlesegerät DYNATECH MR 5000 (Dynatec Laboratories, Frankreich) detektiert.

2.2.5 Bestimmung der Proliferation mit dem CellTiter-Blue-Kit

Anlehnend an Ahmed et al. (1994) wurde zur Bestimmung der Proliferation der CellTiter-Blue-Kit von Promega (Mannheim) verwendet. Dieser beruht auf einer fluorometrischen Meßmethode bei der Resazurin zu Resorufin reduziert wird. Als Cofaktor dient das durch die Zellen gebildete NADPH. Die absorbierte Menge ist direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen. Die gebildete Menge an Resorufin kann fluorometrisch bei einer Anregung von 544 nm und einer Emission von 590 nm im Kammernplattenlesegerät DYNATECH MR 5000 (Dynatec Laboratories, Frankreich) detektiert werden. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurden 2×10^4 Zellen/cm² in 96-Kammernplatten eingesät. Das Gesamtvolumen pro Kammer betrug 100 μl Medium. Zum entsprechen-

den Zeitpunkt wurden 20 μl gebrauchsfertige CellTiter-Blue Lösung zu jeder Kammer gegeben und kurz durchmischt. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 37 °C im Brutschrank wurde die Absorption der Zellen im DYNATECH MR 5000 Kammernplattenlesegerät (Dynatec Laboratories, Frankreich) ausgelesen. Die gemessene Fluoreszenz wurde gegen die Zeit dargestellt und ist proportional zur Zellzahl.

2.2.6 May-Grünwald-Giemsa-Färbung

Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurden die Zellen zur Kontrastverbesserung mit der May-Grünwald-Giemsa-(MGG)-Lösung koloriert. Dabei wird das Zytoplasma durch den basischen Farbstoff Methylenblau schwach blau, und das Chromatin des Zellkerns durch den saueren Farbstoff Eosin violett markiert. Das Medium der Zellen wurde entfernt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Zur Markierung des Zytoplasmas wurden die Zellen 3 min mit 100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ May-Grünwald-Lösung (Merck, Darmstadt) bei RT angefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit H_2O mehrmals gewaschen. Für die Färbung des Kernchromatins wurden die Zellen 15 min mit 200 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ Giemsa-Lösung (1:20 verdünnt in H_2O ; Merck, Darmstadt) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die luftgetrockneten Objektträger mit einem Tropfen PBS benetzt und eingedeckelt. Die weitere histologische Beurteilung der Zellen erfolgte unter dem Durchlichtmikroskop (Leitz, Wetzlar).

2.2.7 Immunozytochemischer Nachweis von Albumin und des EGFR

Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen mit 400 μl einer 4 % (v/v) Paraformaldehyd-Lösung (PFA) pro Kammer für 30 min im Zellkulturinkubator bei 37 °C fixiert. Anschließend wurde die Fixierlösung abgekippt, und die Kammern 2 \times 5 min mit 400 μl PBS bei RT gewaschen. Für den Nachweis des intrazellulären Albumins wurden die Zellen mit 80 μl eines 1:100 verdünnten Albumin-Antikörpers (Upstate über Biomol, Hamburg) in PBS-T (0,3 % (v/v) Triton-X) pro Kammer für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Abnahme der Antikörperlösung wurden die Zellen 3 \times 10 min mit 100 μl PBS pro Kammer gewaschen. Für die Fluoreszenzmarkierung des primären Anti-Maus-Antikörpers wurde Anti-Kaninchen-IGg gekoppelten Rhodamin Red (Dianova, Hamburg) verwendet. Dazu wurde 80 μl des 1:100 verdünnten Rhodamin Reds pro Kammer gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kammern 2 \times 15 min mit 100 μl PBS gewaschen. Die Markierung des Zellchromatins erfolgte final durch erneutes inkubieren mit 100 μl PBS 1:2000 mit Hoechstreagenz verdünnt. Nach dem Lufttrocknen wurden

zur Signalverstärkung die Objektträger mit einem Tropfen Fluoromount beschichtet, eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Die Analysen erfolgten am Fluoreszenzmikroskop BX 60 (Olympus, Hamburg) und wurden mit der Fluoreszenzmikroskopkamera Colorview XS (Olympus, Hamburg) dokumentiert.

Der Nachweis des EGFR erfolgte analog. Der primäre Antikörper (Biogenesis, Großbritannien) wurde in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Nukleinsäure-Präparation

DNA-Präparation und Genotypisierung nach Schwanzbiopsie

Zur Bestimmung des Genotyps der Expansionszucht wurde vier Wochen alte Mäuse genotypisiert. Dazu wurde genomische DNA aus der Schwanzbiopsie nach einem veränderten Protokoll von Hogan et al. (1994) isoliert. Den Mäusen wurde circa 1 cm des Schwanzendes abgeschnitten und ü.N. in 500 μ l Verdaupuffer bei 55 °C im Wasserbad inkubiert. Das Inkubat wurde bei 20.000 $\times g$ für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und für 5 min auf einem Rüttler gemischt. Anschließend wurde 1/3 Vol (v/v) einer 5 M NaCl-Lösung hinzugefügt und erneut für 5 min gemischt. Nach Zentrifugation bei 20.000 $\times g$ für 5-10 min wurde der Überstand ohne obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Die DNA wurde mit 1 Vol (v/v) Isopropanol bei -20 °C präzipitiert, pelletiert und 2 mal mit 70 % (v/v) EtOH gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde in H₂O resuspendiert. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurde der Genotyp mittels konventioneller PCR (Abschnitt 2.3.3) analysiert.

Verdaupuffer:

Konzentration	Komponente
50 mM	Tris
100 mM	EDTA
100 mM	NaCl
10 % (w/v)	SDS
0,2 mg/ml	Proteinase K

RNA-Präparation

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen, über reversible Bindung an eine Silicamembran, erfolgte mit dem RNeasy-Isolations-Kit (Quiagen, Hilden). Die Durchführung richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Zusätzlich wurde die RNA mit RNase-free DNase I (Quiagen, Hilden) nach Herstellerangaben versetzt.

Für die Isolation von Gesamt-RNA aus Organen wurde 100 mg Gewebe in TriReagent homogenisiert. Die Isolation erfolgte nach Herstellerangaben, basierend auf der RNA-Isolation nach Chomczynski und Sacchi (1987). Das Homogenat wurde 10 min bei $12.000 \times g$ zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit $250 \mu\text{l}$ Chloroform pro ml TriReagent versetzt. Nach Durchmischung und Inkubation bei RT für 10-15 min wurde erneut zentrifugiert, der Überstand überführt und mit 1 Vol (v/v) Isopropanol präzipitiert. Das Pellet wurde mit 70% (v/v) EtOH gewaschen und in DNase I Puffer (Quiagen, Hilden) resuspendiert. Die RNA wurde zusätzlich mit RNase-free DNase I (Quiagen, Hilden) für 30 min bei RT inkubiert und Phenol-Chloroform extrahiert. Für die Extraktion wurde die Lösung im Verhältnis 1:1 mit der Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (Verhältnis 25:14:1) versetzt und für 1 min gemischt. Anschließend wurde das Gemisch zur Phasentrennung 5 min bei $20.000 \times g$ zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde mit 1 Vol (v/v) Isopropanol präzipitiert, 2 mal mit 70% (v/v) EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in DEPC- H_2O gelöst.

2.3.2 cDNA-Synthese

Für die Reverse Transkription (RT) wurden $1 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA, $2 \mu\text{g}$ p(DT)₁₅ Primer (Roche, Mannheim) und 5 mM jeden dNTPs in $20 \mu\text{l}$ H_2O gelöst und für 5 min bei 65°C denaturiert. Anschließend wurden $8 \mu\text{l}$ 5 x RT-Puffer, 10 mM DTT, 40 U RNA guard und 400 U M-MLV reverse Transkriptase (Invitrogen, Niederlande) zu einem finalen Volumen von $40 \mu\text{l}$ zugegeben. Die Reaktion erfolgte bei 37°C für 50 min und wurde bei 70°C für 15 min inaktiviert.

2.3.3 Polymerasekettenreaktion

Konventionelle PCR

Die konventionelle PCR (Saiki et al., 1988) erfolgte mit dem Taq-Polymerase System (Qiagen, Hilden) in einem Gesamtvolumen von 25 μl . Der Reaktionsansatz enthielt als Matrize 100 ng DNA bzw. 2 μl synthetisierte cDNA. Die Reaktion erfolgte in einem TRIO Thermoblock (Biometra, Göttingen). Die Annealingtemperaturen und Zyklenzahlen sind der Tabelle 2.2 (s.29) zu entnehmen. Die Elongationszeit m [sek] wurde in Abhängigkeit zu der Produktlänge (1 s/10 bp) gewählt. Zur Analyse der Produkte wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt 2.3.4).

Reaktionsansatz für das Taq-Polymerase-System (Qiagen, Hilden):

Das Temperaturprofil der zyklischen Amplifikationen :

Vol	Komponente	Konzentration
12,75 μl	H ₂ O	
2 μl	cDNA/DNA	100 ng
2,5 μl	10×Taq-PCR Puffer	1×
1,25 μl	Primer forward [4 μM]	0,2 μM
1,25 μl	Primer reverse [4 μM]	0,2 μM
4 μl	dNTP-Mix [je 1,25 mM]	200 μM
1, μl	Taq-Polymerase [5 U/ μl]	1,25 U

n Zyklen	{	5 min	95 °C
		45 sek	95 °C
		30 sek	Tab.2.2 °C
		m sek	72 °C
		5 min	72 °C
		∞	4 °C

Tab. 2.2: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Gen	Sequenz	Referenz	Produktlänge [bp]	Annealingtemperatur [°C]	Zykluszahl
mAhR ^{-/-}	158: 5'-CTG AAT GAA CTG CAG GAC GA-3' 159: 5'-ATA CTT TCT CGG CAG GAG CA-3' 443: 5'-ggA TTT gAC TTA ATT CCT TCA gCg g-3' 5'-TCT tgg gCT CgA TCT tGt gTC Agg AAC Agg-3'	Jackson Laboratories (USA)	172	60	35
mAhR	5'-GGA CCA GTG TAG AGC ACA AA-3' 5'-GGC TGA AGT GGA GTA GCT A-3'		512	53	35
mAhR-LC	5'-GAC AGT TTT CCG GCT TCT TG-3'		150	60	40
mAhRR	5'-CGC TTC TGT AAA TGC TCT CGT-3' 5'-GTT GGA TCC TGT AGG GAG CA-3'		163	60	40
mβ-actin	5'-AGT CCA GAG GCT CAC GCT TA-3' 5'-CTA CAA TGA GCT GCG TGT GG-3'		450	62	35
mCYP1A1	5'-TAG CTC TTC TCC AGG GAG GA-3' 5'-CCC ACA GCA CCA CAA GAG ATA-3'	Abel et al. (1996)	499	62	40
mCYP1A2	5'-AAG TAG GAG GCA GGC ACA ATG TC-3' 5'-GAC GTC AGC ATC CTC TTG CT-3'	Choudhary et al. (2003)	400	57	40
mCYP1B1	5'-GGC ACT TGT GAT GTC TTG GA-3' 5'-AGC TGA GCT CGC TGT CTA CC-3'	Choudhary et al. (2003)	848	59	40
mCYP2B10	5'-GTC CGT CAT GTC TCG AGG AG-3' 5'-GCC CAA TGT TTA GTG GAG GA-3'	Choudhary et al. (2003)	383	57	40
mCYP3A11	5'-GAC TTC TCC TTC TCC ATG CG-3' 5'-ATA GAG CTT TGC TGT CCC CC-3'	Choudhary et al. (2003)	394	59	40
mHPRT-1	5'-CGG CTT TCC TTC ATT CTG TC-3' 5'-GCG TCG TGA TTA GCG ATG ATG AAC-3' 5'-CCT CCC ATC TCC TTC ATG ACA TCT-3'	Srinivas et al. (2005)	155	57	35

Real-time PCR

Die Real-time PCR und Produktdetektion wurde am LightCycler (Roche, Mannheim) durchgeführt. Die PCR Reaktion wurde in einem Volumen von 20 μl durchgeführt und enthielt 10 μl 2 \times QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Quiagen, Hilden), 0,5 μM Primer, 2 μl cDNA und DEPC behandeltem H_2O . Die Aktivierung der HotStarTaq DNA-Polymerase erfolgte für 15 min bei 95 °C. Die einzelnen Bedingungen für die verschiedenen PCR-Amplifikationen, wie Annealingtemperatur, Zyklenzahl und Primersequenz sind in der Tabelle 2.2 aufgeführt. Die Denaturierung erfolgte bei 95 °C für 15 sek. Die Elongationszeit betrug 30 sek bei 72 °C und 2 sek bei 72 °C zur Fluoreszenzdetektion. Am Ende der PCR-Amplifikation wurde zur Kontrolle der Produkte die Schmelzkurve angezeigt. Zur quantitativen Auswertung wurden Eichgeraden mit sequenzspezifischen Produkten in Konzentrationen von 1×10^3 bis 1×10^8 Transkripten erstellt. Die Analyse der PCR-Amplifikation und Schmelzkurve erfolgt mit der LightCycler Software 3.

2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zum Nachweis von Nukleinsäuren wurden native Agarosegele verwendet. Hierzu wurde 0,8-1,5 % (w/v) Agarose mit $100 \text{ ng} \times \text{ml}^{-1}$ EtBr in $1 \times$ TBE gelöst. Als Laufpuffer diente $1 \times$ TBE. Die aufzutrennenden Proben wurden mit Lade-Puffer versetzt. Es wurde eine Spannung von 1-5 V/cm Elektrodenabstand angelegt, und solange elektrophoretisch aufgetrennt, bis die Farbstoffmarker die erforderliche Trennstrecke zurückgelegt hatten. Die Produkte wurden densitometrisch mit dem Fluor-S Max Scanner (Bio-Rad, Deisenhofen) unter UV Licht detektiert.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Isolation von Proteinen

Die Gewinnung von Gesamt-Proteinextrakt aus Zelllysate erfolgte nach einem Protokoll von Haas et al. (2002). Nach Abnahme des Zellmedium wurden die Zellen $3 \times$ mit eiskaltem PBS gewaschen und in 100 $\mu\text{l}/10 \text{ cm}^2$ Oberfläche in RIPA lysiert. Die Lysate wurden mit Hilfe einer Nadelspritze (BD Microlance 3, 27G3/4) mehrmals geschert und

für 30 min im Eisbad inkubiert. Abschließend wurden die Lysate bei $16.000 \times g$ und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und die Proteinkonzentration bestimmt.

RIPA:

Konzentration	Komponente
50 mM	Tris-HCl pH 7,4
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1 % (v/v)	Nonidet P-40
1 mM	Natrim-Orthovanadat
0,25 % (w/v)	Deoxycholatsäure
1 mM	NaF
2 % (v/v)	Protease-Inhibitor-Cocktail
1 mM	PMSF

Für die Isolation von Proteinen aus Organen wurden ca. 100 mg Gewebe in frisch angesetztem Lysispuffer mit Hilfe eines Ultra-Thorax im Eisbad homogenisiert. Das Homogenat wurde für 5 min bei $20.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

Lysispuffer:

Konzentration	Komponente
25 mM	Tris-HCl pH 7,2
150 mM	NaCl
0,1 mM	EDTA
2 % (v/v)	Triton X-100
0,1 % (v/v)	SDS
1 % (w/v)	Deoxycholatsäure
0,05 % (w/v)	NaN_3
2 % (v/v)	Protease-Inhibitor-Cocktail
2,5 mM	DTT
2,5 mM	PMSF

Für die Gewinnung von nukleären und zytosolischen Proteinen wurde die fraktionierte Isoalton durchgeführt. Aus Organen wurde ca. 100 mg Gewebe in Hypotonpuffer mit einem Ultra-Thorax homogenisiert. Zur besseren Proteinausbeute wurden die Homogenate zusätzlich mit 30 × Hüben mit Hilfe eines Elvehjem Potter (Braun, Melsungen) im Eisbad gepottert. Das Homogenat wurde für 10 min bei $3.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand (zytosolische Proteine) wurden abgenommen und tiefgefroren. Die Pellets wurden in einem Hochsalzpuffer resuspendiert. Die Suspension wurde mit 15 × Hüben gepottert, und danach bei $14.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand enthielt die nukleären Proteinen.

Hypotonpuffer:		Hochsalzpuffer:	
Konzentration	Komponente	Konzentration	Komponente
20 mM	Hepes/KOH pH 7,9		Hypotonpuffer
20 mM	NaF	420 mM	NaCl
1 mM	Na ₃ VO ₄	20 % (v/v)	Glycerol
1 mM	Na ₄ P ₂ O ₇		
125 nM	Okadasäure		
1 mM	EDTA		
1 mM	EGTA		
2 % (v/v)	Protease-Inhibitor-Cocktail		

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach (Bradford, 1976) erfolgt mit dem Bio-rad (Deisenhofen) Protein Assay bzw. mit dem BC Assay von Uptima (Interchim, Mannheim). Die einzelnen Teilschritte wurden nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. Die Konzentration der Proteine wurde mit Hilfe einer Eichgeraden ausgewertet.

2.4.3 Western-Blot Nachweis von Albumin, AhRR, EGFR, ERK1/2 und GAPDH

Die Auftrennung der Proteine erfolgte über Acrylamidgele nach der Methode von (Laemmli, 1970). Äquivalente Proteinmengen (15-20 µg) wurden 5 min bei 95 °C in Ladepuffer aufgekocht. Die Proben wurden in einem Sammelgel und anschließend im Trenngel bei 150 V bis zur vollständigen Auftrennung der Markerproteine elektrophoretisch aufgetrennt.

Ladepuffer:		Sammelgel:	
Konzentration	Komponente	Konzentration	Komponente
60 mM	Tris	5 % (v/v)	Acrylamid
1 % (v/v)	SDS	130 mM	Tris-HCl pH 8,8
10 % (w/v)	Saccharose	0,1 % (v/v)	SDS
0,1 % (v/v)	β -Mercaptoethanol	0,1 % (w/v)	APS
0,01 % (w/v)	Bromphenolblau	0,01 % (v/v)	TEMED

Trenngel:		Laufpuffer:	
Konzentration	Komponente	Konzentration	Komponente
7,5 % (v/v)	Acrylamid	25 mM	Tris
400 mM	Tris-HCl pH 8,8	520 mM	Glycin
0,1 % (v/v)	SDS	17 mM	SDS
0,1 % (w/v)	APS		
0,01 % (v/v)	TEMED		

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Die PVDF-Membran wurde für 10 sek in Methanol aktiviert und anschließend für 5 min in Wasser neutralisiert. Das Gel wurde zur Entfernung von SDS und zur Äquilibration gemeinsam mit der PVDF-Membran für 20 min in Anodenpuffer äquilibriert. Der Transferblot (Trans blot SD, Bio-Rad, Deisenhofen) wurde wie folgt von der Anode ausgehend aufgebaut: sechs Lagen 3M-Whatman-Papier durchfeuchtet in Anodenpuffer, die Membran, das Gel, die Zellophanmembran, 1 Lage 3M-Whatman getränkt in Anodenpuffer und mit fünf in Kathodenpuffer durchfeuchteten 3M-Whatman-Lagen komplementiert. Der Naß-Trocken-Transfer zur PVDF-Membran wurde für 1 h bei konstanter Stromstärke von 2 mA pro cm² Membranfläche durchgeführt. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran mit Ponceau-Lösung gefärbt und in H₂O entfärbt.

Anodenpuffer:		Kathodenpuffer:	
Konzentration	Komponente	Konzentration	Komponente
39 mM	Tris	17 mM	Tris
1 mM	SDS	1 mM	SDS
25 mM	Ameisensäure	24 mM	Taurin
0,05 % (w/v)	NaN ₃	0,05 % (w/v)	NaN ₃
20 % (v/v)	Methanol	20 % (v/v)	Methanol

Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungen wurde die PVDF-Membran nach für 30 min bei RT in 5 % (w/v)- Magermilchpulver in TBS-T inkubiert. Nachfolgend wurde die PVDF-Membran mehrmals innerhalb von 10 min bei RT in TBS-T gewaschen. Die Membran wurde mit dem primären Antikörper (siehe Tab.2.3) in 5 % (w/v)- Magermilch-TBS-T ü.N. bei 4 °C und am nächsten Tag für 1 h bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in TBS-T, wurde die Membran für 1 h bei RT mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Ungebundene Zweitantikörper wurde durch mehrmaliges Waschen der Membran in TBS-T entfernt.

TBS-T:

Konzentration	Komponente
10 mM	Tris-HCl pH 7,2
15 mM	NaCl
0,1 % (v/v)	Tween 20

Tab. 2.3: Verwendete Antikörper

Antikörper	Molekulargewicht [kDa]	verwendete Verdünnung	Lieferant	Zweitantikörper	Verdünnung Zweitantikörper
AhRR	84	1:200	selbst hergestellt	Anti-Kaninchen-IGg-HRP	1:2500
Albumin	64	1:300	Biogenesis	Anti-Kaninchen-IGg-HRP	1:2500
EGFR	180	1:1000	Upstate	Anti-Kaninchen-IGg-HRP	1:2500
P-EGFR pY845	170	1:1000	Biosource	Anti-Kaninchen-IGg-HRP	1:2500
ERK 1/2	42/44	1:2000	CellSignaling	Anti-Kaninchen-IGg-HRP	1:2500
P-ERK 1/2	42/44	1:1000	CellSignaling	Anti-Kaninchen-IGg-HRP	1:2500
GAPDH	146	1:50	BioTrend	Anti-Schaf-IGg-HRP	1:1000

Die Detektion des Peroxidase gekoppelten Zweitantikörpers erfolgte mit dem ECL plus Western Blotting Detektion Reagenz der Firma Amersham (Freiburg). Dazu wurde die Membran für 5 min mit dem Reagenz inkubiert. Die Chemilumineszenz wurden mit dem Fluor-S-MAX MultiImager (Bio-Rad, Deisenhofen) visualisiert. Die Quantifizierung der Bandenstärke erfolgte mit der Software Quantity One 4.1.0 (Bio-Rad, Deisenhofen).

Antikörperablösung von der PVDF-Membran

Für die Entfernung der Antikörper P-EGFR (Y845) und P-ERK1/2 von der PVDF-Membran wurden die Membranen in einem Ablösepuffer für 30 min bei 70 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden diese kurz in TBS-T gewässert und konnten für das Immunoblotting von gesamt EGFR und ERK1/2 eingesetzt werden.

Ablösepuffer:

Konzentration	Komponente
62,5 mM	Tris-HCl pH 6,8
2 % (v/v)	SDS
100 mM	β -Mercaptoethanol

2.5 Datenanalyse

Computerunterstützte Datenanalyse

Die Generierung von Primern wurde mit Hilfe der Online-Software BiSearch durchgeführt (Tusnady et al., 2005). Für Sequenzvergleichsrecherchen wurden BLAST-Analysen (Altschul et al., 1990) in den Sequenz-Datenbanken des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) durchgeführt. Für weitere Datenanalysen wurde das Programmpaket HUSAR (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) der DKFZ Heidelberg über das W2H WWW Interface (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de:8080/menu>) verwendet.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit dem Programm Analysis 3.2 von Soft Imaging Systems (Münster) ausgewertet. Die Berechnung gewonnener Daten erfolgte mittels Excel des Microsoft Office Pakets (Microsoft, USA) und die Darstellung der Diagramme mit pro Fit 5.6.3 (QuantumSoft).

Auswertung und Statistik

Da es sich um unverbundene, normalverteilte Stichproben handelte, wurde zur Überprüfung auf Gleichheit der Mittelwerte der zweiseitige Studentische t -Test herangezogen. Es wurde ein zweiseitiger Test durchgeführt, da eine Substanz theoretisch einen induzierenden oder einen inhibierenden Effekt aufweisen kann. Die Hypothese, daß sich die Mittelwerte zweier Gruppen signifikant voneinander unterscheiden, wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der *in vivo* -Untersuchungen

Gegenstand dieser Arbeit war eine nähere Aufklärung zur Expression und Induktion von Arylhydrokarbon-Rezeptor regulierten Genen in Geweben der Maus, wobei im besonderen auf den AhRR eingegangen werden sollte. Bisher sind nur aus Zellkulturstudien Ergebnisse über die Expression und die Wirkung des AhRR auf andere Gene verfügbar. Aus diesem Grund wurde zunächst das Expressionsprofil der *AhRR* mRNA und die Wirkung der Induktion des *AhRR* auf die Expression von *CYP1A1* in verschiedenen Geweben adulter, weiblicher und männlicher C57BL/6 Mäuse untersucht.

3.1.1 Ergebnisse der Expressionsanalyse des *AhRR* in C57BL/6 und AhR-defizienten Mäuse

Die Gewebeverteilung der *AhRR* mRNA von jeweils sieben adulten, weiblichen und männlichen C57BL/6 Mäusen im Alter von sechs bis acht Wochen ist in Abb.3.1 zusammengefaßt. Die *AhRR* mRNA-Expression war im Herzen und Gehirn am höchsten. Die mittleren *AhRR* Transkriptmengen lagen bei 20.7×10^3 und 26.1×10^3 Transkripte/ μg gesamt RNA im Gehirn bzw. im Herzen. In den anderen untersuchten Organen war der *AhRR* mRNA-Gehalt um das 2- bis 10-fache niedriger. Die entsprechenden mRNA-Gehalte waren: Niere $9.9 \times 10^3 \pm 7.9 \times 10^3$, Leber $2.6 \times 10^3 \pm 2.5 \times 10^3$, Milz $1.6 \times 10^3 \pm 7.5 \times 10^2$, Lunge $1.9 \times 10^3 \pm 9.3 \times 10^2$, Thymus $1.7 \times 10^3 \pm 7.2 \times 10^2$, Ovarien $1.1 \times 10^4 \pm 4.7 \times 10^3$ und im Testis $4.1 \times 10^3 \pm 2.6 \times 10^2$. Es war kein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied bezüglich der Expression von *AhRR* mRNA in den Geweben von weiblichen und männlichen Tieren nachweisbar. Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß die *AhRR* mRNA konstitutiv in den Geweben der Maus exprimiert ist und die Expressionshöhen gewebespezifisch reguliert sind.

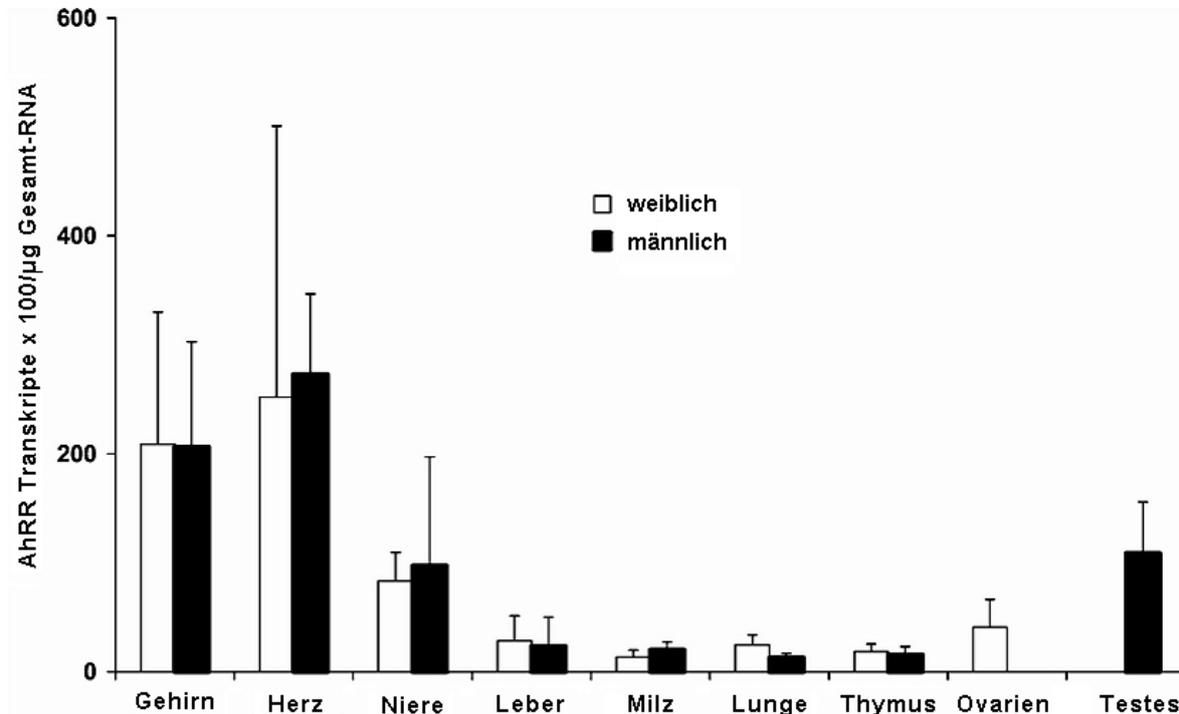


Abb. 3.1: Gewebeverteilung der *AhRR* mRNA in adulten weiblichen und männlichen C57BL/6 Mäusen. Gewebe von sieben weiblichen und sieben männlichen Tieren wurden untersucht. Die Mittelwerte \pm Standardabweichung sind dargestellt.¹

3.1.2 Der AhR reguliert die konstitutive Expression des *AhRR*

In vitro -Untersuchungen zeigten, daß der *AhRR* über XRE AhR reguliert ist. Deshalb wurde untersucht, ob der AhR einen regulatorischen Effekt auf die konstitutive *AhRR* Expression hat. Dazu wurde die Expression des *AhRR* in AhR-defizienten ($AhR^{-/-}$) Mäusen untersucht. In Abb.3.2 sind die Ergebnisse der *AhRR* mRNA-Expression in unterschiedlichen Geweben von AhR-Wildtyp und $AhR^{-/-}$ -Mäusen dargestellt. Generell war der *AhRR* mRNA-Gehalt in $AhR^{-/-}$ -Mäusen um 2 bis 3 Zehnerpotenzen niedriger gegenüber Wildtyp-Tieren. Beispielsweise war im Gehirn im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren in den knock-out-Tieren der *AhRR* um den Faktor zwanzig niedriger exprimiert. Die Ergebnisse der Untersuchung verdeutlichen, daß der AhR die Expression des *AhRR* entscheidend reguliert.

¹Anmerkung: Aufgrund des kleinen Werteumfangs und der biologischen Variabilität können bei der statistischen Auswertung die Werte der Standardabweichung die Größenordnung der berechneten Mittelwerte annehmen.

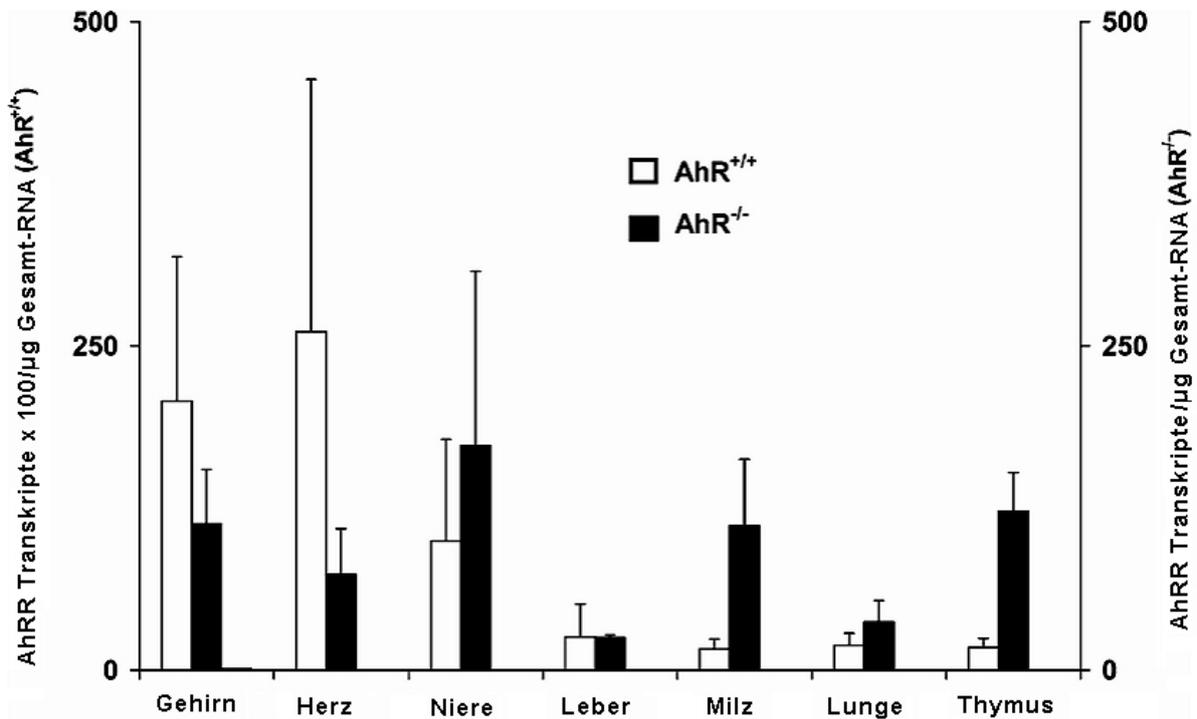


Abb. 3.2: Gewebeverteilung der *AhRR* mRNA in AhR-Wildtyp und AhR^{-/-}-C57BL/6 Mäusen. Gewebe von sieben weiblichen C57BL/6-Mäusen, sowie zwei weiblichen und zwei männlichen AhR^{-/-}-Tieren wurden untersucht. Unterschiedliche y-Achsenkalierung beachten. Die Mittelwerte \pm Standardabweichung sind dargestellt.

3.1.3 Effekte von B[a]P auf die Expression von *AhRR* mRNA und *CYP1A1* mRNA in unterschiedlichen Geweben der Maus

Transiente Genüberexpressionsstudien in der Zellkultur weisen auf eine negative Rückkopplungsregulation des AhRR auf die Transkription AhR-abhängiger Gene hin (Baba et al., 2001; Evans et al., 2005; Karchner et al., 2002; Mimura et al., 1999). Ferner soll nach *in vitro* -Befunden die *AhRR*-Expressionshöhe die Induktion der *CYP1*-Genfamilie kontrollieren (Tsuchiya et al., 2003). Dennoch ist die physiologische Funktion des AhRR noch unklar. Aus diesem Grund wurde geprüft, ob die Induzierbarkeit des *AhRR* gewebespezifisch kontrolliert wird und ob eine Induktion des *AhRR* modulierend auf die

Induzierbarkeit von *CYP1a1* wirkt. Um die Induzierbarkeit der *AhRR* mRNA in unterschiedlichen Organen zu untersuchen, wurden weibliche Mäuse mit einer einmaligen Dosis an B[a]P (10 mg/kg) behandelt und der *AhRR* mRNA-Gehalt nach 24 h quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb.3.3 aufgeführt. Die höchste Induzierbarkeit der *AhRR* mRNA wurde in der Leber gefunden. Die B[a]P-Behandlung führte zu einer signifikanten und 25-fachen Induktion der *AhRR* mRNA-Expression gegenüber der unbehandelten Gruppe. Eine weitere signifikante Steigerung der *AhRR* mRNA wurde in Milz, Lunge und Ovarien detektiert. Keine signifikante Steigerung der *AhRR* mRNA-Konzentration konnte in Gehirn und Herzen nachgewiesen werden. Diese Daten zeigen, daß die *AhRR* mRNA nach Belastung mit einem AhR-Agonisten gewebespezifisch reguliert wird. Dabei scheint das Ausmaß der Induktion unabhängig von der konstitutiven Expressionshöhe zu sein.

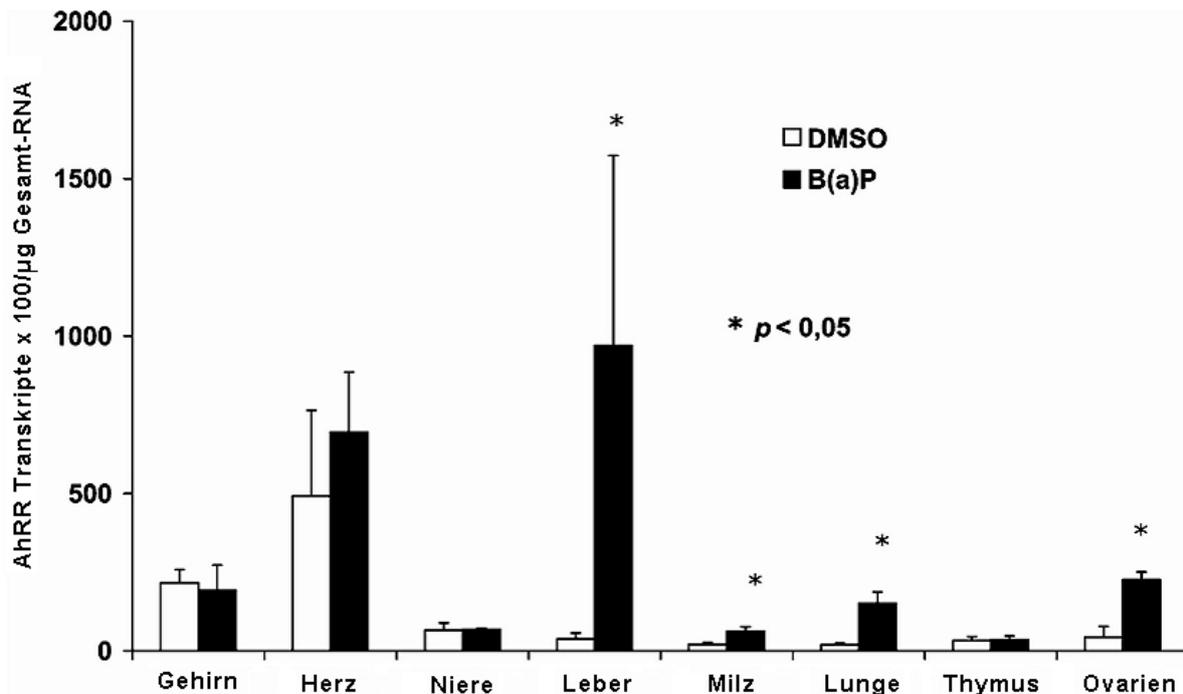


Abb. 3.3: B[a]P-induzierte *AhRR* mRNA-Expression in unterschiedlichen Geweben von C57BL/6-Mäusen. B[a]P (10 mg/kg bw) wurde i.p. injiziert. Gewebe von vier Tieren pro Gruppe wurden analysiert. Die Mittelwerte \pm Standardabweichung, mit signifikanten Unterschieden $* p < 0.05$ gegenüber der Kontrolle nach Student's *t*-Test, sind dargestellt.

Um zu klären, ob die gewebespezifische Expression und Induzierbarkeit mit AhR-abhängigen Genen einhergeht, wurde die Expression von *CYP1A1* gemessen. Mit Ausnahme von Gehirn und Thymus war die Expression von *CYP1A1* signifikant erhöht (Abb.3.4). Die höchste Induktion war im Herz und der Leber nachweisbar. Diese Daten lassen keinen engen Zusammenhang zwischen der konstitutiven und induzierbaren Induktion von *CYP1A1* erkennen. Entgegen der Befunde an der Zellkultur unterliegt *in vivo* die Induzierbarkeit von *CYP1A1* offensichtlich nicht einer Feedback-Regulation über den AhRR.

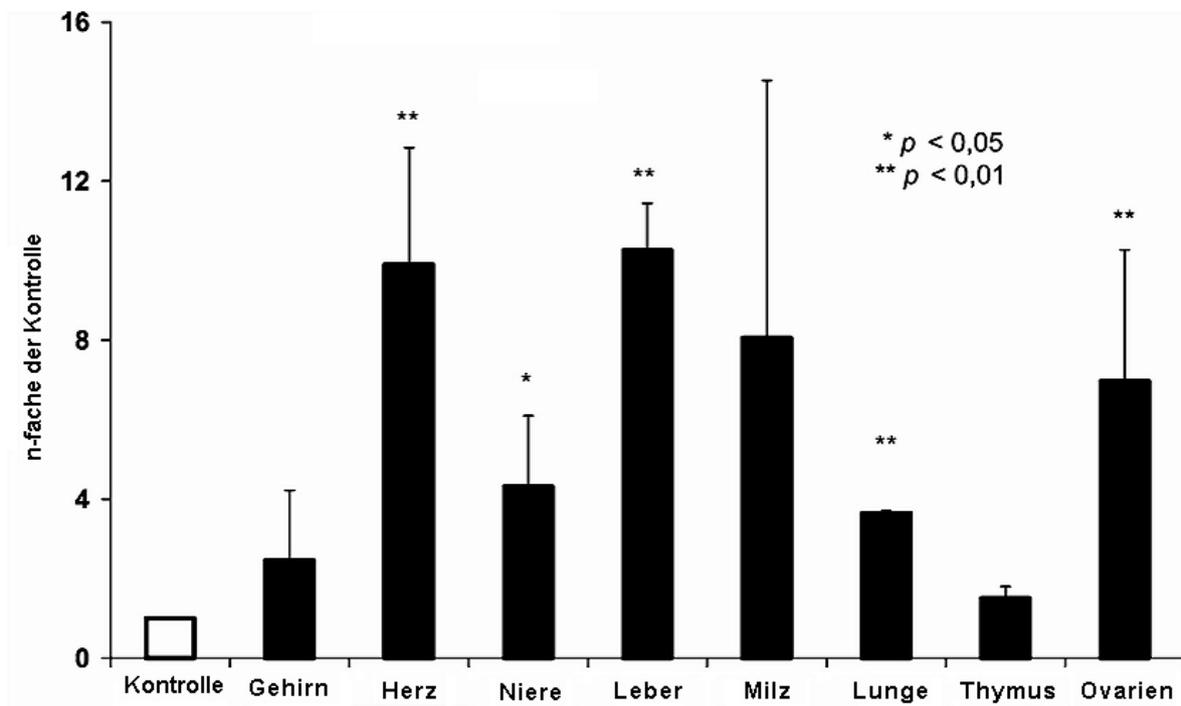


Abb. 3.4: **Einfluß von B[a]P auf die *CYP1A1*-Expression.** Beschreibung der Durchführung wie in Abb.3.3. Der Mittelwert der Kontroll Gruppe wurde gleich eins gesetzt. Die Mittelwerte \pm Standardabweichung sind dargestellt. Signifikanten Unterschieden * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ gegenüber der Kontrolle nach Student's *t*-Test.

3.1.4 Expression von *AhR* und *AhRR* mRNA während der fötalen Leberreifung

Die bisher vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß der AhR die Expression des *AhRR* beeinflußt, aber der *AhRR* nicht die Expression und Induktion AhR-abhängiger Gene in adulten Geweben. Aus frühen Arbeiten ist ferner bekannt, daß sich die Expression des AhR in fötalen Geweben mit den Reifestadien ändert (Abbott et al., 1995). Um eine Wirkung auf die Expression AhR-abhängiger Gene während der fötalen Entwicklung zu untersuchen, wurde das Expressionsprofil des *AhR* und des *AhRR* in fötalen Lebern zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien (GD 13.5, GD 15.5 und GD 17.5), sowie neugeborenen Mäusen untersucht.

Zur Untersuchung des Expressionsprofils von *AhR* und *AhRR* mRNA *in vivo* wurden die Lebern von Feten zu den Entwicklungsstadien GD 13.5, GD 15.5 und GD 17.5, sowie neugeborenen Mäusen entnommen. Für die Analyse wurden drei Würfe mit durchschnittlich 8 Feten bzw. Jungtieren herangezogen. Zum Zeitpunkt GD 13.5 war die Transkriptmenge der *AhRR* mRNA im Mittel rund 12000 Transkripte/ μ g Gesamt-RNA. Hingegen war die Expression des *AhR* zu diesem Reifestadium zweifach niedriger. Allerdings waren die Unterschiede nicht signifikant. Mit zunehmender Leberreifung (GD 15.5 und GD 17.5) nahm die Transkriptmenge des *AhRR* ab. Zum Trächtigkeitstag GD 15.5 war die mRNA-Expression des *AhRR* im Mittel 5400 Transkripten/ μ g Gesamt-RNA nachweisbar. Dagegen stieg die *AhR* mRNA-Expression um mehr als das 5-fache an. Zum Entwicklungszeitpunkt GD 17.5 war die *AhR* mRNA-Expression um das 20-fache höher als die Expression des *AhRR*. In neugeborenen Mäusen war der *AhR* 30-fach stärker exprimiert als die *AhRR* mRNA (Abb.3.5). Die *AhR* mRNA-Konzentration der neugeborenen Mäuse lagen in der Größenordnung adulter Tiere.

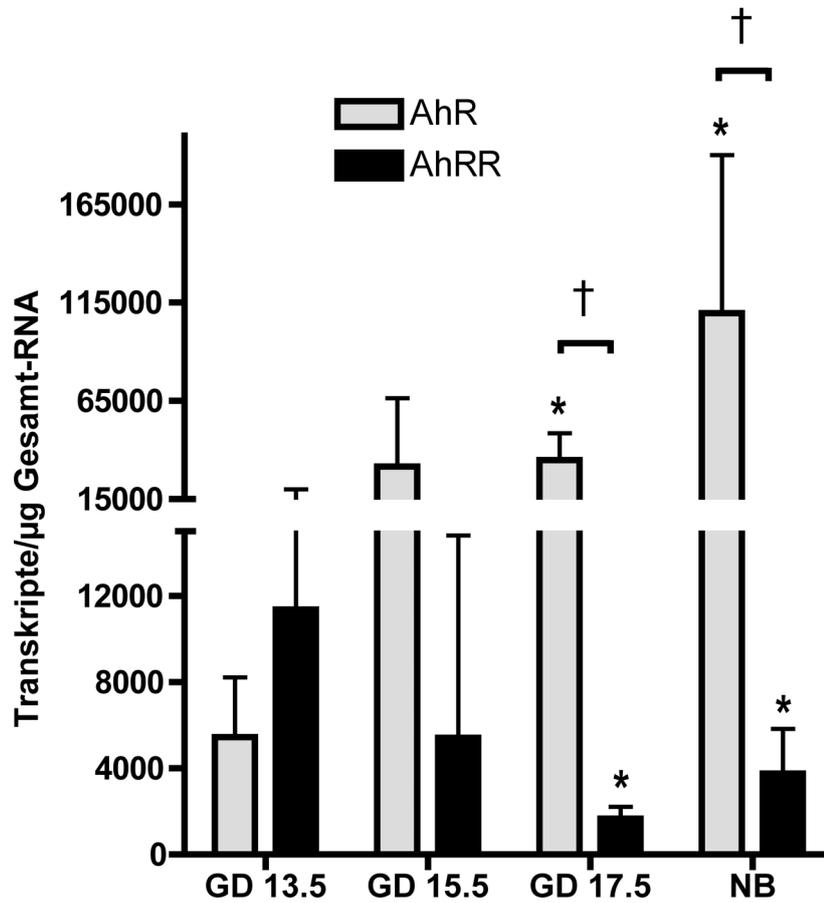


Abb. 3.5: Analyse der *AhR* und *AhRR* mRNA-Expression in der Leber zu den Trächtigkeitstagen GD 13.5, GD 15.5 und GD 17.5, sowie neugeborenen Mäusen. Die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Transkripte pro μ g Gesamt-RNA sind dargestellt. * signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression gegenüber GD13.5, † signifikanter Unterschied zwischen *AhR* und *AhRR* mRNA-Expression zum entsprechenden Entwicklungszeitpunkt, nach Student's *t*-Test mit $p < 0.05$.

Zur Verifizierung der Expressionsanalyse wurde die Proteinexpression des AhRR mittels Western-Blot untersucht. Dazu wurden die Lebern der Feten eines Wurfes entnommen, vereinigt, nach fraktioneller Proteinisolierung der AhRR immunpräzipitiert und im-

munchemisch nachgewiesen. Ein typisches Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb.3.6 dargestellt. Es waren drei Banden, im Bereich von 75, 45 und 40 kD, nur in der Kernfraktion nachweisbar. Aus der primären Struktur des AhRR errechnet sich ein Molekulargewicht in einer Größenordnung von 75 kD. Bei den niedermolekularen Banden könnte es sich um Abbauprodukte handeln. Die Untersuchung zeigte, daß bereits zum Trächtigkeitstag GD 13.5 das AhRR Protein exprimiert und nukleär lokalisiert ist.

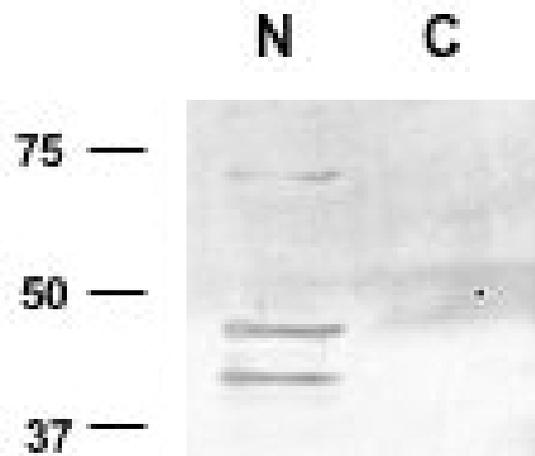


Abb. 3.6: **Nachweis der nukleären Lokalisation des AhRR mittels Western-Blot-Analyse.** Kern- und Zytosolextrakt nach Proteinisolation aus acht fötale Lebern GD 13.5. Das Fluoreszenzsignal bei 75 kD in der Kernextraktspur entspricht in etwa der erwarteten Größe des AhRR.

N = Kernextrakt, C = Zytosolextrakt

Diese Ergebnisse zeigen, daß mit zunehmenden Reifungsstadien der Feten die Expression des AhR und des AhRR in Lebern der Feten invers korreliert ist und untermauern einen Einfluß des AhR auf die Leberentwicklung. Gleichfalls deuteten diese Ergebnisse auf eine Funktion des AhRR während der Leberreifung hin.

3.2 Ergebnisse der *in vitro* -Untersuchung an primären fötalen Leberzellen

Die gewonnenen *in vivo* -Ergebnisse zeigen, daß in adulten Tieren die Expression des *AhRR* gewebespezifisch und hauptsächlich über den AhR reguliert wird. Zugleich zeigen die Daten in adulten Tieren, daß der AhRR offensichtlich keinen Effekt auf die Regulation AhR-abhängiger Gene zu haben scheint. Darüber hinaus begründen die gewonnenen Ergebnisse in der fötalen Leber, neben dem Literatur bekannten Einfluß des AhR, eine mögliche Wirkung des AhRR auf die Gewebeentwicklung.

Um die Funktion des AhR und des AhRR während der fötalen Leberreifung näher zu charakterisieren wurde die Kultivierung von primären fötalen Leberzellen etabliert, da dieses System eine Vereinfachung der Untersuchungsmethoden erlaubt. Diese kultivierten Zellen wurden hinsichtlich ihrer Morphologie, Proliferation, Expression und Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme untersucht.

3.2.1 Morphologische Analyse der fötalen Leberzellkultur

Es wurden Feten des Trächtigkeitstages GD 13.5 aus C57BL/6 Mäusen entnommen. Aus einem trächtigen Tier wurden im Mittel 8-9 Feten erhalten. Dabei konnten im Durchschnitt nach der beschriebenen Technik etwa $5,3 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^6$ Zellen aus einer Leber isoliert werden. Die Vitalität der Zellen betrug im Mittel $94,8 \pm 1,3$ %. Für die Kultivierung wurden 2×10^4 Leberzellen/cm² auf mit Rattenschwanzkollagen Typ I (Gibco, Karlsruhe) kollagenisierte Zellkulturgefäße eingesät. Nach 4,5 h nach Einsaat waren ca. 60 % der Zellen adhärent. Weitere 24 h später bildeten die Zellen eine für Leberzellen typischen epithelialen Zellverband aus. Die Zellmorphologie ist polygonal, am äußeren Rand des Zellverbands sind fingerförmige Zellausläufer ersichtlich. Mit Zunahme der Kultivierungsdauer konnte eine Differenzierung der Zellen beobachtet werden (Abb. 3.7, 3.8). Nach einer Kulturdauer von 96 h zeigen sich Cluster und nach einer Kulturdauer von 120 h sind leberähnliche Strukturen erkennbar. Erkennbar sind in Abb. 3.8 die für fötale Leberzellen typische Mehrkernigkeit, teilweise sind gallengangähnliche Anlagen und Kupfferzellen sichtbar. Die ovalen bis runden Zellkerne sind von einem ausgeprägten granulären Zytoplasmahof umgeben. Später zeigen die Zellen ein Domänenwachstum (Abb. 3.7).

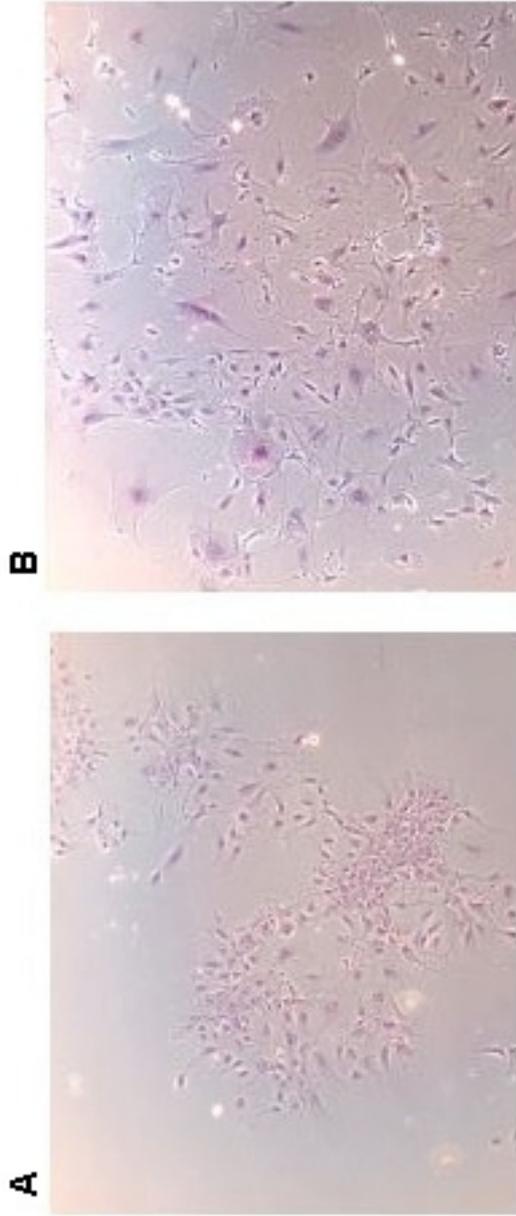


Abb. 3.7: Lichtmikroskopische Aufnahme von fötalen Leberzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Kultur. Differenzierung fötaler Zellen über die Kulturdauer. A) LM Aufnahme von fötalen Leberzellen 96 h in Kultur. Domänenwachstum. B) LM Aufnahme einer Leberzelldomäne nach 168 h in Kultur. (100-fache mikroskopische Vergrößerung)

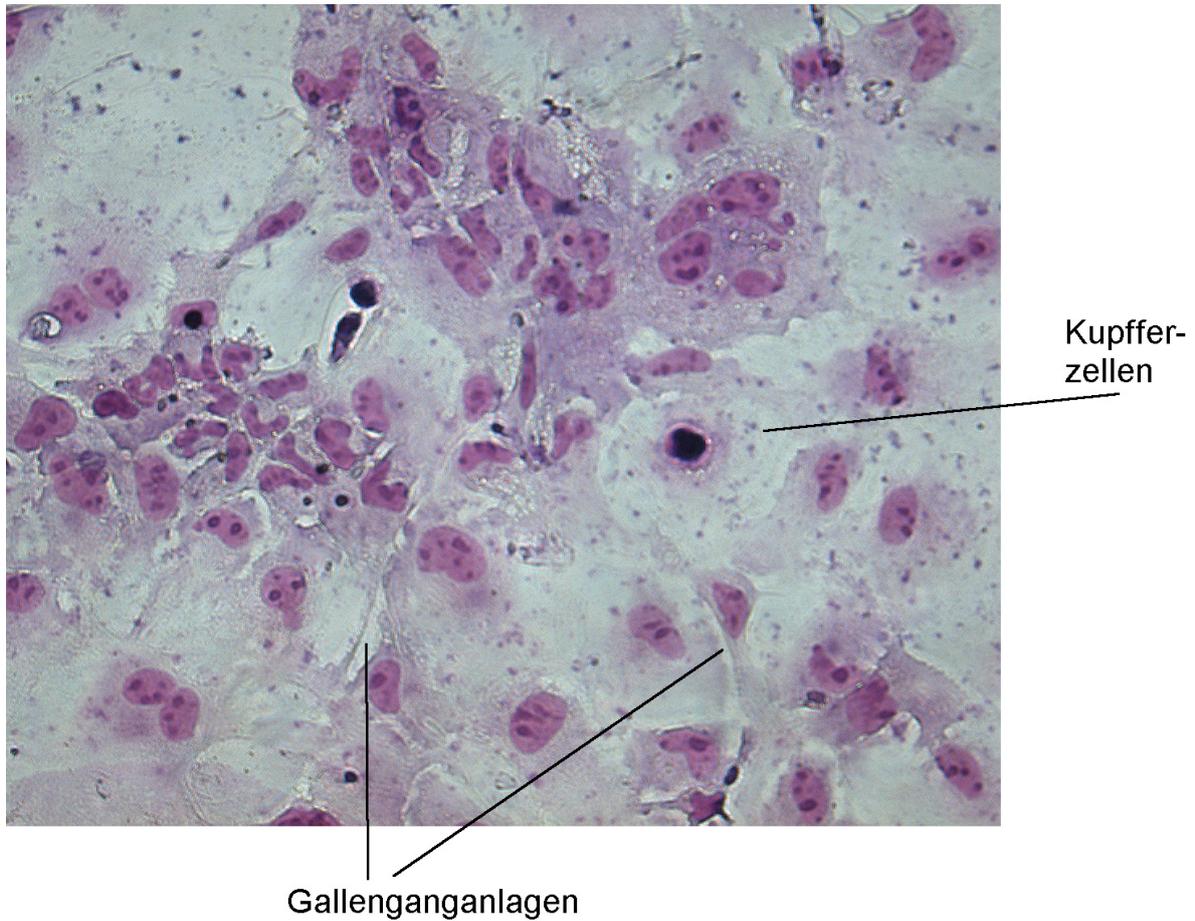


Abb. 3.8: Morphologische Charakterisierung fötaler Leberzellen nach einer **Kulturdauer von 120 Stunden**. LM Aufnahme nach MGG-Färbung von fötalen Leberzellen nach 120 h in Kultur. Erkennbar sind mehrkernige, hepatozytenähnliche Zellen, Anlagen von Gallengängen, sowie Kupferzellen (400-fache Vergrößerung).

Zur weiteren Charakterisierung der Leberzellen wurde diese hinsichtlich der Synthese von Albumin untersucht. Das in der Leber synthetisierte Albumin gilt als prominenter Marker für die Charakterisierung von Hepatozyten. In Abbildung 3.9 ist eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von mit Anti-Albumin gefärbten fötalen Leberzellen nach 48h in Kultur dargestellt. Erkennbar ist wiederum die typische Zusammenlagerung der Zellen in Domänen und die typische perinukleäre und zytosolische Verteilung von Albumin. Teilweise sind granuläre Strukturen erkennbar.

Eine Auswertung der Albumin positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl ergab, daß im Mittel $70,1 \pm 1,5$ % der Zellen Albumin exprimieren. Die anderen Zellen wurden nicht näher charakterisiert. Bei diesen Zellen könnte es sich um Progenitorzellen, biliäre Epithelzellen, sinusoidale Endothelzellen, Ito-Zellen oder Kupfferzellen handeln. Zusätzlich konnte durch Westernblot-Analyse mit Anti-Albumin-Antikörper die Ergebnisse der immunfluoreszenz Untersuchungen der fötalen Leberzellkultur bestätigt werden. Für eine Abschätzung der gebildeten Menge an dem Albumin wurde die Intensität des Signals in Relation zum dem ubiquitär exprimierten Glukose-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Enzym (GAPDH) bezogen. Der Immunoblot mit Anti-GAPDH- und Anti-Albumin-Antikörper in Abb. 3.9 zeigt unterschiedlich lang kultivierte fötale Leberzellen exemplarisch auf. Das Zellysate stammte von Zellen, die 72 h, 96 h und 144 h kultiviert wurden. Das GAPDH-Signal wurde bei 146 kD und die Albumin-Bande bei 64 kD detektiert. Zu jedem untersuchten Zeitpunkt ist die Intensität des Albumin-Signals in Relation zum GAPDH-Signal um ein vielfaches stärker. Zu allen Untersuchungszeitpunkten ist die Albuminsynthese in den Zellen unverändert, eine densitometrische Auswertung erbrachte keinen Unterschied. Diese Befunde bestätigen, daß fötale Leberzellen in Kultur hepatozytenähnliche Morphologien entwickeln und in der Lage sind, leberähnliche Strukturen auszubilden.

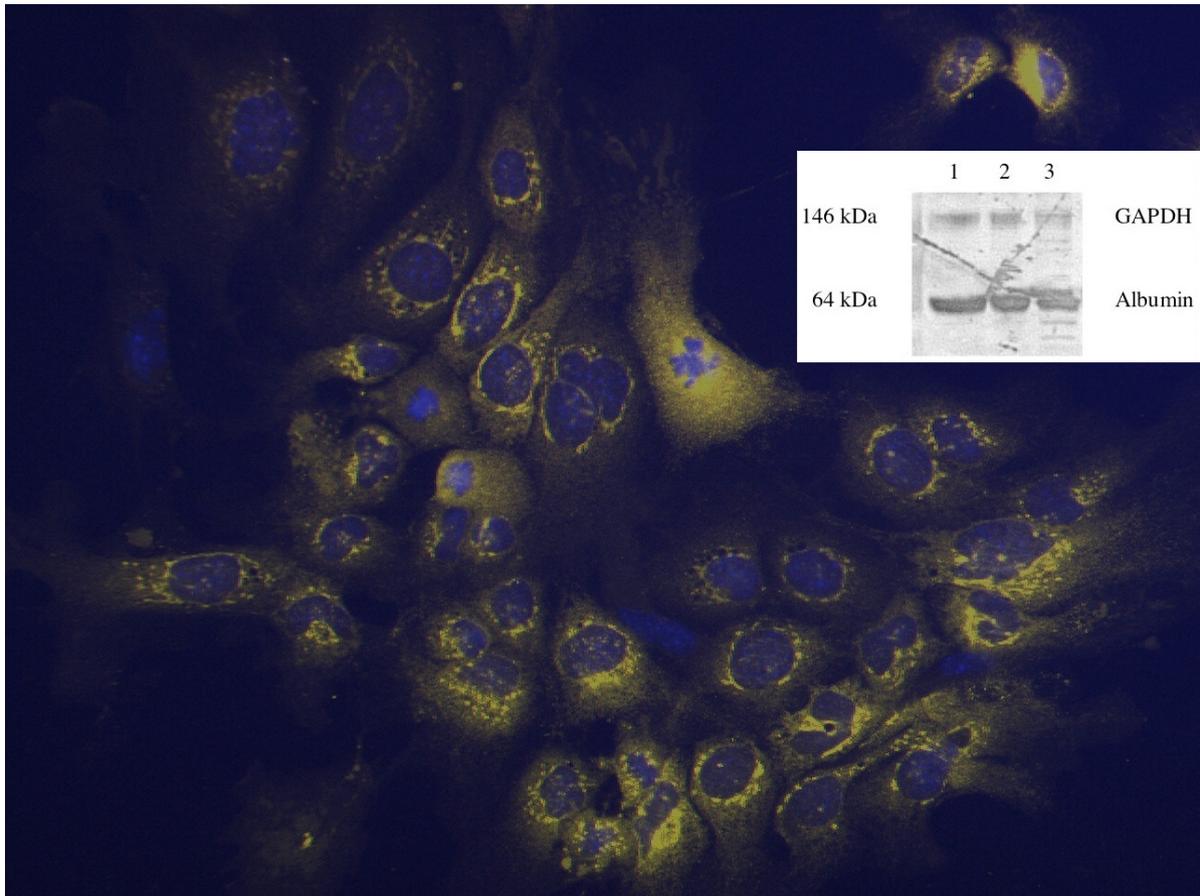


Abb. 3.9: **Immunzytochemischer Nachweis des Hepatozytenmarkers Albumin in fötalen Leberzellen in Kultur und im Westernblot.** Hintergrund: Überlagerung der fluoreszenzmikroskopischen Signale der Hoechst und Anti-Albumin-Antigen-Reaktion von fötalen Leberzellen nach 48 h in Kultur. Granuläre und perinukleäre Verteilung von Albumin (400-fache LM Vergrößerung). Eingefügt: Westernblot Analyse mit Anti-GAPDH- und Anti-Albumin-Antikörper von fötalen Leberzelllysat. Spur 1 - 72 h, Spur 2 - 96 h und Spur 3 - 144 h in Kultur. Obere Reihe Fluoreszenzsignal der Anti-GAPDH Antigen Reaktion. Untere Reihe Fluoreszenzsignal der Anti-Albumin-Antigen-Reaktion. 15 μ g Zelllysate wurden in jede Spur pro Zeitpunkt aufgetragen.

3.2.2 Proliferation fötaler Leberzellen

Bereits die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigten, daß fötale Lebern in Kultur proliferieren. Zur Quantifizierung der Proliferation wurde die Zunahme der Zellzahl mit dem CellTiter-Blue-Kit (Promega, Mannheim) bestimmt. Dazu wurden 3×10^3 Zellen pro Well in eine 96-Wellplatte eingesät und 24 h nach Einsaat die Proliferation quantifiziert.

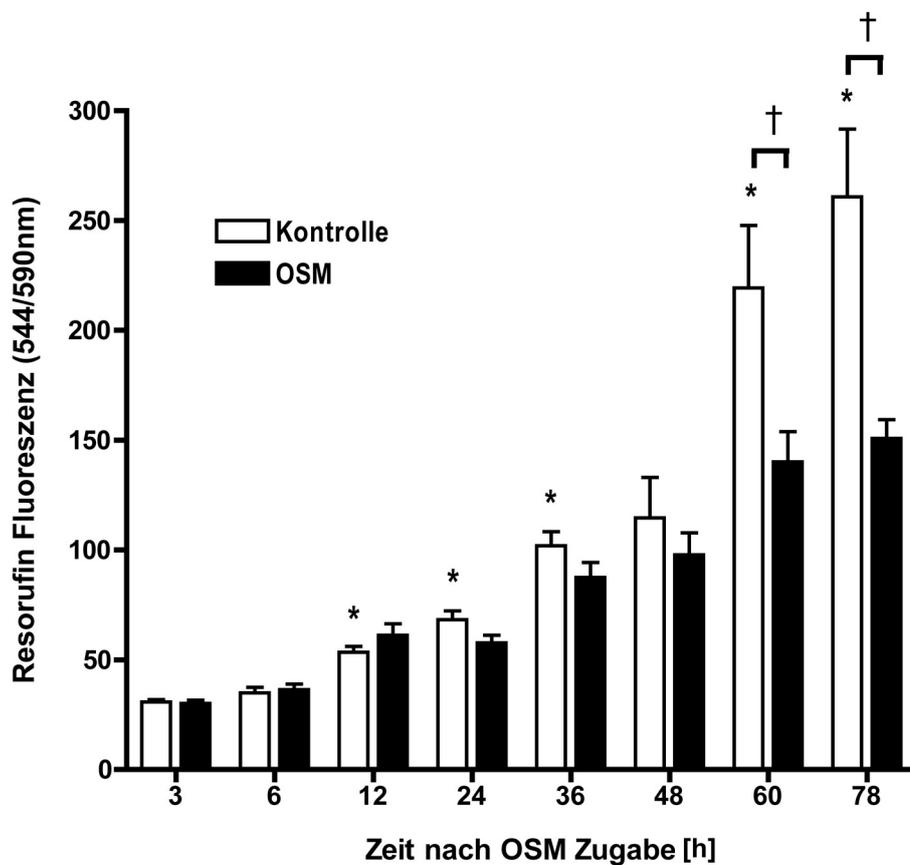


Abb. 3.10: Bestimmung der Proliferation fötaler Leberzellen mit dem CellTiter-Blue-Kit (Promega, Mannheim). Die mit 10 ng/ml OSM behandelten Zellen sind durch schwarze Balken und die unbehandelten Zellen durch weiße Balken dargestellt. Die untersuchten Gruppen bestanden zu jedem Zeitpunkt aus $n = 6$ Werten. Die Mittelwerte \pm Standardabweichung sind dargestellt. * signifikantem Unterschied im Vergleich zum vorherigen Zeitpunkt, † signifikanter Unterschied gegenüber der OSM Gruppe, nach Student's t -Test mit $p < 0.05$.

In Abb.3.10 ist der Verlauf der Zunahme der Zellzahl über einen Zeitraum von 78 h dargestellt. 12 h nach Versuchsbeginn ist eine signifikante Zunahme der Zellproliferation gegenüber den Ausgangswerten nachweisbar. Die aus den Daten berechnete Verdopplungszeit betrug 24 h.

Zur Verifizierung dieser Daten wurden die Zellen 24 h nach Einsaat mit 10 ng/ml Oncostatin M (OSM) inkubiert. Von OSM ist bekannt, daß es Leberzellen auf Kosten der Proliferation in die Differenzierung führt (Kamiya et al., 1999). Bereits 24 h nach Versuchsbeginn ist die fluorometrisch bestimmte Menge an gebildetem Resorufin in der mit OSM-behandelten Gruppe geringer im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zu allen untersuchten Zeitpunkten war die Proliferation der OSM behandelten niedriger als die der unbehandelten Zellen. Die Generationszeit wird durch OSM auf 32 h verlängert. Diese Untersuchung zeigt, daß fötale Leberzellen in Kultur proliferieren und responsiv auf OSM reagieren.

3.2.3 Molekularbiologische Charakterisierung der konstitutiven und induzierten Expression von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen in fötalen Leberzellen

Zielorgan für viele Fremdstoffe ist die Leber, deshalb wurde untersucht, ob typische fremdstoffmetabolisierende Enzyme der Phase I in den kultivierten Zellen transkribiert werden. Zunächst wurde die konstitutive Expression dieser Gene untersucht. Die Daten sind in der Tabelle 3.1 dargestellt. Die Ergebnisse sind als Transkripte pro 5×10^5 β -Aktin dargestellt. Die *CYP1B1*-Expression wurde mittels konventioneller PCR detektiert. Die Gene *AhR*, *AhRR*, *CYP1A1*, *CYP1A2* und *CYP1B1* werden konstitutiv exprimiert. Die Expression des *AhRR* war etwa 23-fach höher exprimiert im Vergleich zum *AhR*. Im Mittel waren nach einer Kulturdauer von 120 h etwa 1000 Transkripte des *AhR* pro 5×10^5 β -Aktin nachweisbar. Die Expression der unterschiedlichen Gene *CYP1A1* und *CYP1A2* lag in gleicher Höhe. Eine Expression von *CYP2B*- und *CYP3A*- Formen war zu dem gewählten Untersuchungszeitpunkt nicht detektierbar.

Tab. 3.1: Konstitutive Expression fremdstoffmetabolisierende Enzyme der Phase I.
 Angegeben sind die Transkripte pro 5×10^5 β -Aktin

Gen	Mittelwert der Transkripte \pm Standardabweichung
AhR	1017 \pm 449
AhRR	23865 \pm 15120
CYP1A1	1068 \pm 748
CYP1A2	793 \pm 417
CYP1B1	detektierbar
CYP2B10	nicht detektierbar
CYP3A11	nicht detektierbar
CYP3A13	nicht detektierbar

Zur Untersuchung der Induzierbarkeit AhR-abhängiger Gene wurden die fötalen Leberzellen 48 h nach Einsaat für 72 h mit 10 nM TCDD belastet. Die Kontrollgruppe wurde mit 0,1 % DMSO behandelt. Die Belastung mit TCDD führte zu keiner Induktion von *AhR* mRNA im Vergleich zur Vehikelkontrolle. Das *AhR* mRNA-Expressionsprofil der beiden Gruppen ist nahezu identisch.

Die Untersuchung der Expression AhR-abhängiger Gene weißt Differenzen im mRNA-Expressionsprofil zwischen Kontroll- und TCDD-behandelter Gruppe auf. Der AhR-Ligand TCDD führt zu einer signifikanten Induktion der untersuchten AhR-abhängigen Gene gegenüber der Kontrollgruppe. Durch die Belastung mit TCDD kommt es zu einer 137-fach und signifikant höheren Expression von *AhRR* mRNA verglichen mit der DMSO-behandelten Gruppe. Die Expression von *CYP1A1* mRNA ist um das 64-fache in der TCDD-belasteten Gruppe signifikant höher gegenüber der Kontrollgruppe. Die Induktion der *CYP1A2* mRNA-Expression ist signifikant, fällt mit einer 26-fachen Erhöhung der Expression in der TCDD-Gruppe etwas niedriger aus im Vergleich zu der mRNA-Expression von *AhRR* und *CYP1A1* aus. Die *CYP1B1* mRNA-Expression der TCDD-belasteten Gruppe ist um mehr als das zweifache höher als die der DMSO-behandelten Gruppe. Eine Expression von *CYP2B*- und *CYP3A*- Formen war zu dem gewählten Untersuchungszeitpunkt erneut nicht detektierbar.

Parallel dazu wurde neben dem Induktor TCDD die Induktion AhR-abhängiger Gene mit dem zum AhR geringer affinen Induktor B[a]P in den fötalen Leberzellen untersucht. Diese wurden 48 h nach der Einsaat für 72 h mit 10 μ M B[a]P belastet. Die Kontrollgruppe wurde mit 0,1 % THF behandelt.

Die Belastung mit B[a]P führte zu keiner Induktion von *AhR* mRNA im Vergleich zur Vehikelkontrolle. Das *AhR* mRNA-Expressionsprofil der beiden Gruppen ist nahezu identisch und entspricht in etwa der Expressionshöhe der TCDD-belasteten Gruppe.

Die Untersuchung der Expression AhR-abhängiger Gene nach B[a]P-Belastung führt zu unterschiedlich starken Induktionen im mRNA-Expressionsprofil zwischen Kontroll- und B[a]P-behandelter Gruppe.

Durch die Belastung mit B[a]P kommt es zu einer 27-fachen und signifikant höheren Expression der *AhRR* mRNA verglichen mit der THF-behandelten Gruppe. Die Induktionsantwort der *AhRR* mRNA war ca. 4-fach schwächer als die nach TCDD-Belastung.

Die Untersuchung der Expression von *CYP1A1* mRNA war nach B[a]P etwa 43-fach gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Im Vergleich zur TCDD-behandelten Gruppe war die Expression von *CYP1A1* niedriger.

Die Analyse der *CYP1A2* mRNA-Expression zeigte eine dreifache Induktion der B[a]P-belasteten Gruppe gegenüber der Lösungsmittelgruppe auf. Dieser Effekt war nicht signifikant aufgrund der hohen Varianz in der THF-behandelten Gruppe.

Die *CYP1B1*-Expression wurde durch B[a]P ca. zweifach erhöht. Es wurde kein Unterschied in der Induktionsantwort zwischen AhR-Agonisten TCDD und B[a]P gefunden.

CYP2B- und *CYP3A*- Formen konnten nicht detektiert werden.

In Abhängigkeit des Liganden zeigten die kultivierten, fötalen Leberzellen eine unterschiedlich starke Induktion AhR-abhängiger Gene. Mit Ausnahme von *CYP1B1* führte eine Belastung mit 10 nM TCDD jeweils zu einer stärkeren Induktion der mRNA-Expression der untersuchten Genen gegenüber der Belastung mit 10 μ M B[a]P. Unabhängig vom Induktor kommt es auch *in vitro* zu einer hohen *CYP1A*-Induktion neben einer starken *AhRR* mRNA-Induktion.

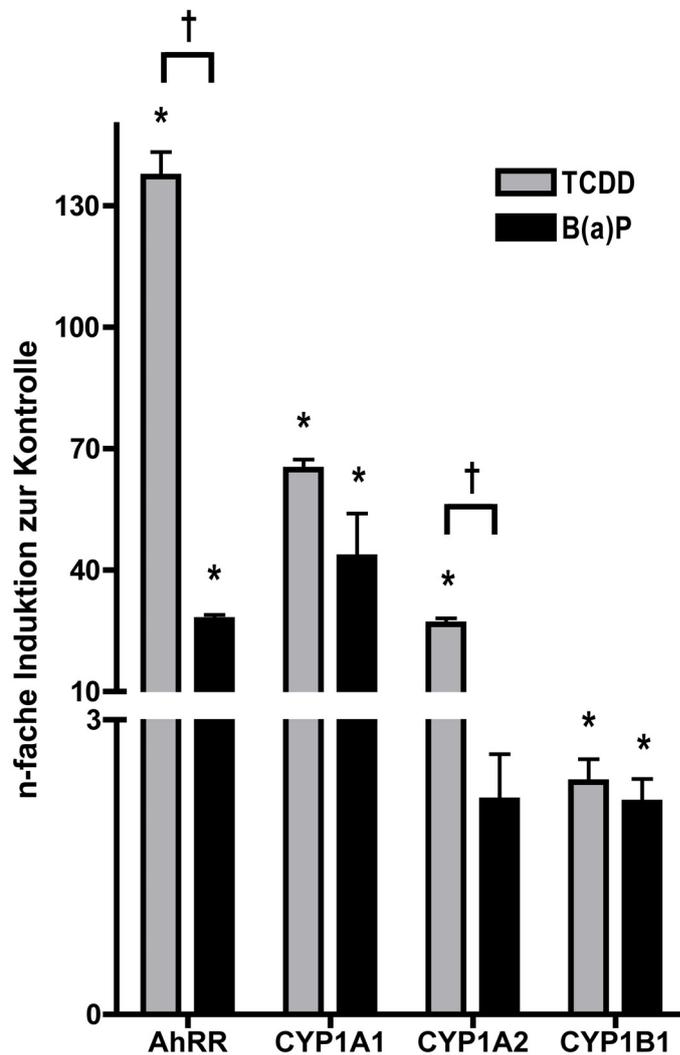


Abb. 3.11: Induzierbarkeit AhR-abhängiger Gene in fötalen Leberzellen in Abhängigkeit von dem Induktor. Dargestellt ist die relative Zunahme der Expression des *AhR*, *AhRR*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* nach einer Belastung mit 10 nm TCDD bzw. 10 μ M B[a]P. Die Zellen wurden 48 h nach Aussaat mit den Stoffen bzw. dem Lösungsmittel für 72 h belastet. Die Mittelwerte \pm Standardabweichung sind dargestellt. * signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe, † signifikanter Unterschied in der n-fachen Induktion gegenüber dem anderen Induktor, nach Student's *t*-Test mit $p < 0.05$. Probengröße pro Gruppe $n = 8$.

3.3 Einfluß von TCDD auf die Replikation fötaler Leberzellen

In den fötalen *in vivo*-Befunden wurde eine inverse Korrelation zwischen *AhR* und *AhRR* Expression deutlich. Ferner konnte im Western-Blot gezeigt werden, daß der *AhRR* nur nukleär und somit vermutlich aktiv vorliegt. Die molekularbiologischen Expressionsanalysen *in vivo* wie *in vitro* deuten nicht auf eine *AhRR*-abhängige negative Feedback-Regulation *AhR*-abhängiger Gene hin.

Aus diesem Grund wurde das etablierte *in vitro*-System genutzt um den Einfluß von *AhR*-Liganden auf das Zellwachstum zu untersuchen. Die Mechanismen, über die *AhR*-Liganden Leberzellen zur Proliferation anregen können, sind weitestgehend unbekannt. Eine Beteiligung von Kofaktoren, wie die Aktivierung von Ras-abhängigen Signalkaskaden oder der Aktivierung der c-*Src*-Kinase, als auch eine Hemmung der Apoptose werden in Betracht gezogen (Schrenk et al., 1992; Schwarz et al., 2000). Zunächst wurde der Wirkung von TCDD auf die kultivierten, fötalen Leberzellen untersucht, ob diese unter TCDD proliferieren und sich als geeignetes *in vitro*-Testsystem für eine weitere mechanistische Untersuchung der Signalwege eignen.

3.3.1 Einfluß von TCDD auf die DNA-Synthese

Für die Untersuchung der Wirkung von TCDD auf das Wachstumsverhalten der fötalen Leberzellen wurde durch BrdU-Einbau die DNA-Synthese bestimmt. Die DNA-Synthese ist proportional zur Proliferation. Für die Studie wurden unbehandelte, mit 10 nM TCDD bzw. mit Lösungsmittel behandelte Leberzellen untersucht. Die BrdU-Inkorporation wurde zeitabhängig verfolgt. Die Zeitpunkte waren 48, 72 und 96 h nach der Behandlung.

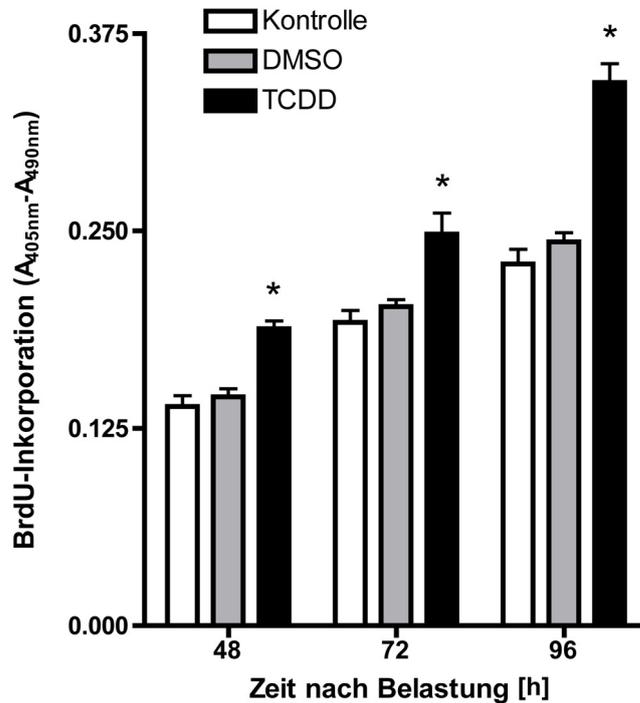


Abb. 3.12: **Einfluß von TCDD auf die Proliferation kultivierter, fötaler Leberzellen.** Nachweis der Proliferation über BrdU-Inkorporation in fötalen Leberzellen. Die Zellen wurden mit TCDD bis zu einem Zeitraum von 96 h belastet. Die weißen Balken stellen die Kontrollgruppe, die grauen Balken die DMSO Gruppe und die schwarzen Balken die TCDD-behandelten Leberzellen dar. Die Mittelwerte \pm Standardabweichung, mit signifikanten Unterschieden $* p < 0.05$ gegenüber der Kontrolle und DMSO Gruppe nach Student's *t*-Test, sind dargestellt. Die Gruppen bestand zu jedem Zeitpunkt aus 24 Einzelwerten.

Die Abb. 3.12 zeigt den Verlauf der induzierten Proliferation von fötalen Leberzellen in Abhängigkeit zur Zeit und zum Induktor. Bereits 48 h nach TCDD-Belastung war der BrdU-Einbau signifikant höher im Vergleich zu der unbehandelten- und Lösungsmittel-Gruppe. Im Mittel war die Proliferation in der TCDD belasteten Gruppe um 24 % höher. Zwischen der unbehandelten und mit Lösungsmittel behandelten Gruppe besteht zu jedem Zeitpunkt kein Unterschied. Nach weiteren 24 h nahm die BrdU-Inkorporation in beiden Kontrollgruppen um 27 % bzw. um 28 % zu. Die TCDD-behandelten Gruppe

nahm um 24 % zu. Die BrdU-Inkorporation war wiederum signifikant gegenüber der Vergleichsgruppe erhöht. Zwischen den Zeitpunkten 72 und 96 h nach Belastung nahm in der Kontroll- und DMSO-Gruppe die BrdU-Einbaumenge um 16 bzw. 17 % zu. In der TCDD-belasteten Gruppe wurde ein Zuwachs von 28 % verzeichnet. 96 h nach Belastung ist die BrdU-Inkorporation in der TCDD-Gruppe signifikant im Mittel um 31 % höher im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Die Befunde zeigen, daß TCDD das Wachstum von fötalen Leberzellen steigern kann. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Studien geprüft, ob TCDD den EGFR aktivieren kann. Um eine Interaktion von TCDD mit dem EGFR und eine Aktivierung des EGFR zu prüfen, wurden fötale Leberzellen auf Glasträger über 120 h kultiviert und für weitere 24 h synchronisiert. Die Belastung der Zellen erfolgte für 5, 10 und 30 min mit 10 nM TCDD bzw. mit 0,1 % DMSO. Mittels mikroskopischer Immunfluoreszenzanalyse wurde die Lokalisation des EGFR mit einem EGFR-Antikörper nachgewiesen. In Abb.3.13 sind die Ergebnisse dargestellt. In der mit dem Lösemittel behandelten Gruppe ist das Fluoreszenzsignal der EGFR an der Zellmembran lokalisiert. Dagegen trat bereits nach 5 min TCDD-Belastung intrazelluläres Clustern des EGFR auf und schon nach 10 min ist der EGFR vorwiegend perinukleär nachweisbar. Eine 30-minütige Belastung der Zellen mit TCDD führte zu einer Relokalisierung des EGFR an die Membran. Das Lösemittel hatte zu keiner Zeit einen Effekt auf den EGFR. Der AhR-Agonist TCDD führt zu einer transienten und schnellen Aktivierung des EGFR.

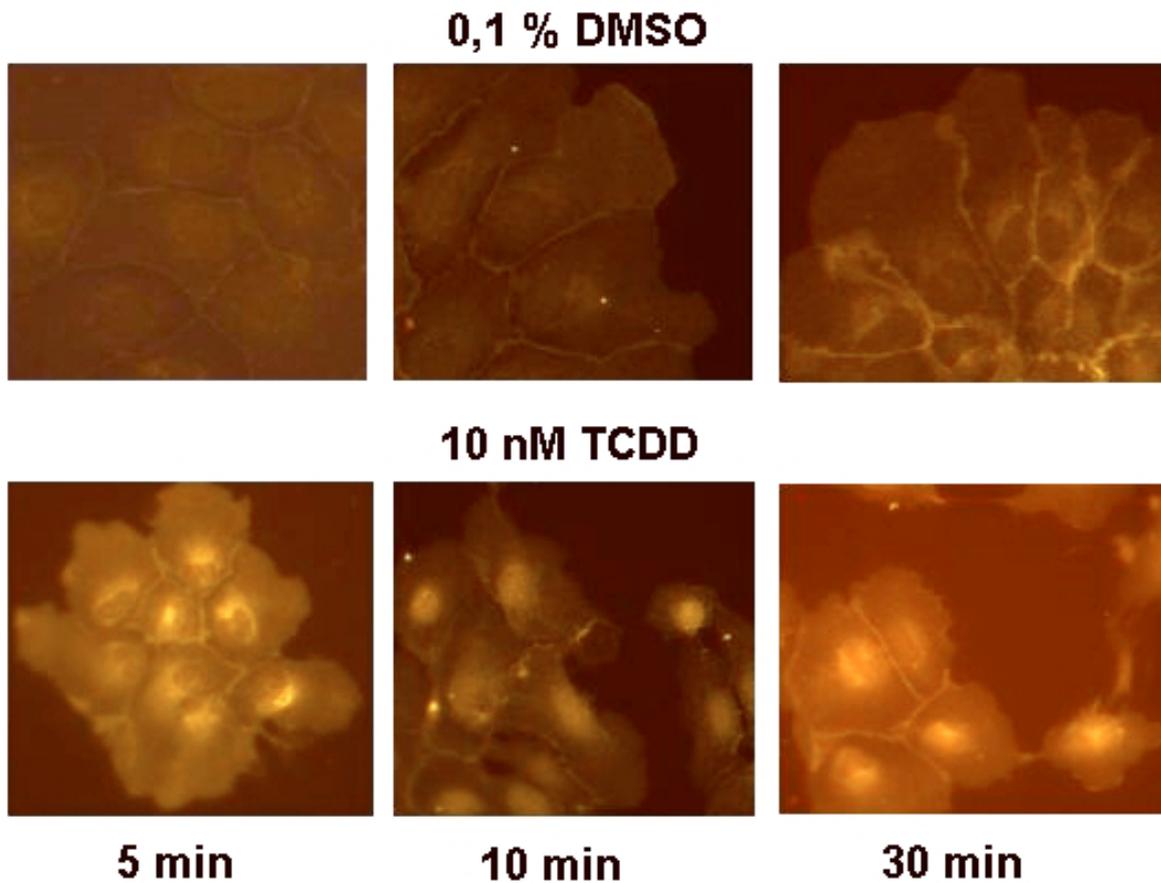


Abb. 3.13: **Transiente Internalisierung des EGFR nach TCDD-Belastung von fötalen Leberzellen.** Immunfluoreszenzanalyse mit EGFR-Antikörper zur Darstellung der EGFR-Lokalisierung. Kultivierte fötale Leberzellen wurden für 5, 10 und 30 min mit 10 nM TCDD bzw. mit DMSO inkubiert. Die obere Reihe zeigt die immunzytochemischen Befunde der Kontrollgruppe. Transmembrane EGFR-Lokalisation. Unten sind die entsprechenden Befunde nach TCDD dargestellt. Clustern des EGFR nach 5 min, perinukleäre Akkumulation nach 10 min und membranständige Lokalisation nach 30 min TCDD-Belastung.

Ergebnisse 3.3 Einfluß von TCDD auf die Replikation fötaler Leberzellen

Zur Verifizierung der Fluoreszenzbefunde der TCDD-abhängigen EGFR-Aktivierung wurden Immunoblots mit Anti-P- und Anti-Gesamt-EGFR-Antikörpern durchgeführt. Der Anti-P-EGFR erkennt spezifisch die Phosphorylierung an der Aminosäure Tyrosin 845 (Y845). Diese Phosphorylierungsposition soll an der c-Src-spezifischen EGFR-Aktivierung beteiligt sein (Moro et al., 2002; Sato et al., 2003; Stover et al., 1995).

Fötale Leberzellen wurden für 120 h in T-25-Kulturflaschen kultiviert und für 24 h synchronisiert. Die Zellen wurden mit 10 nM TCDD bzw. mit 0,1 % DMSO über einen Zeitraum von 5, 10, 15 und 30 min belastet.

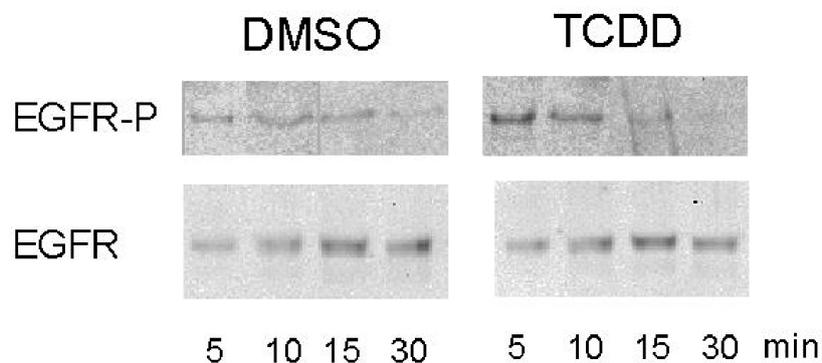


Abb. 3.14: Analyse der TCDD-abhängigen EGFR-Aktivierung im Western-Blot. TCDD-Belastung von fötalen Leberzellen und Nachweis der EGFR-Aktivierung über die Phosphorylierung von Y845. Obere Reihe: Nachweis der Phosphorylierung des EGFR durch P-EGFR-Antikörper. Untere Reihe: Ladungskontrolle mit Gesamt-EGFR-Antikörper.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt die Abbildung 3.14. In der unteren Reihe ist die Gesamtmenge an EGFR als Ladungskontrolle nach Antikörperablösung und Inkubation mit Gesamt-EGFR-Antikörper dargestellt. In der oberen Reihe ist die Menge an phosphoryliertem Y845 nachgewiesen.

Zu allen untersuchten Zeitpunkten konnte in der mit Lösungsmittel behandelten Gruppe ein schwaches Fluoreszenzsignal detektiert werden. Die TCDD-Behandlung führte im Phosphorblot bereits nach 5 min zu einer deutlichen Verstärkung des Signals, das zu späteren Zeitpunkten abnimmt. TCDD stimuliert transient die Phosphorylierung der Aminosäure Y845 des EGFR. Die Daten der Immunzytochemie und der Western-Blot-Analyse zeigen, daß TCDD transient den EGFR in kultivierten, fötalen Leberzellen aktivieren kann.

Ergebnisse 3.3 Einfluß von TCDD auf die Replikation fötaler Leberzellen

Um eine AhR-abhängige Aktivierung des EGFR nach TCDD-Belastung zu demonstrieren, wurden fötale Leberzellen zusätzlich 2 h vor der TCDD-Behandlung mit 1 μ M des AhR-Antagonisten 3'-Methoxy-4'-Nitroflavon (3'-M-4'-NF) präinkubiert.

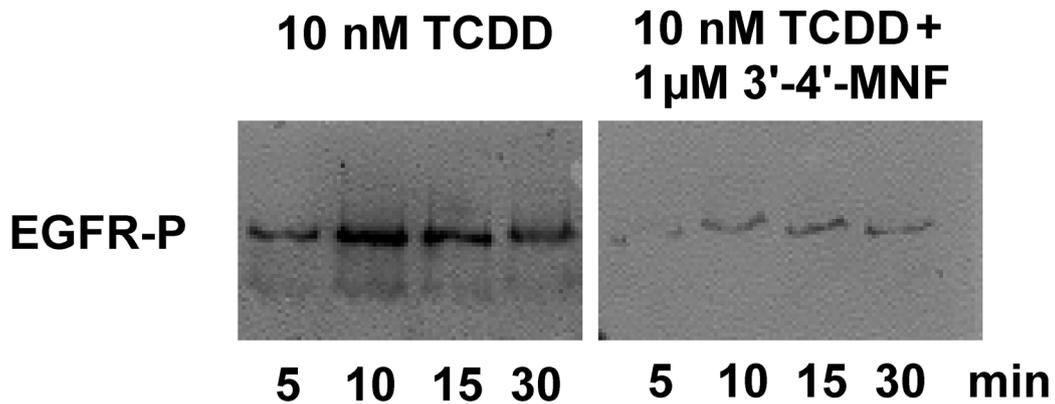


Abb. 3.15: **Nachweis der AhR-abhängigen EGFR-Aktivierung.** Inhibierung der EGFR-Phosphorylierung (Y845) durch 3'-M-4'-NF nach TCDD-Belastung von fötalen Leberzellen. Obere Reihe: Nachweis der Phosphorylierung des EGFR durch P-EGFR-Antikörper. 20 μ g Zelllysate wurden in jeder Spur pro Zeitpunkt aufgetragen.

In Abb. 3.15 ist das Ergebnis dieser Untersuchung im Western-Blot dargestellt. Die Belastung mit TCDD führt zu einer deutlichen Steigerung im Phosphorblot. Dabei ist das Fluoreszenzsignal 10 min nach Belastung am stärksten und nahm mit längerer Belastungsdauer wieder ab. In Gegenwart von 3'-M-4'-NF war die TCDD-Belastung nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal beobachtet. Die TCDD induzierte Phosphorylierung der Aminosäure Y845 des EGFR blieb in Gegenwart des AhR-Antagonisten aus. Diese Daten weisen auf eine AhR-abhängige Aktivierung des EGFR hin.

Die bisherigen Untersuchungen hatten gezeigt, daß TCDD zur Proliferation anregt und den EGFR transient aktiveren kann. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob durch EGFR nachgeschaltete Signalwege eingeschaltet werden. Ein möglicher Zielweg, der in die EGFR-medierte Proliferation des Zellwachstums integriert ist, ist die ERK-Signalkaskade. Folglich wurde die Wirkung von TCDD auf die ERK-Phosphorylierung analysiert. Hierzu wurden Leberzellen für 120 h kultiviert und für 24 h synchronisiert und anschließend für 5, 10, 15 und 30 min mit 0,1 % DMSO und 10 nM TCDD behandelt.

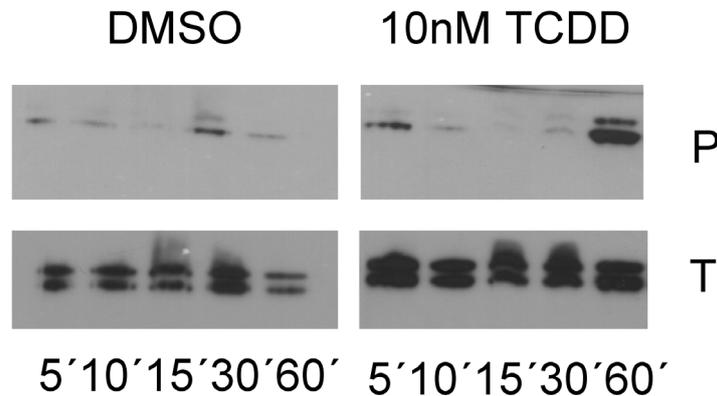


Abb. 3.16: **Einfluß von TCDD auf die Phosphorylierung von ERK1/2.** Western-Blot-Analyse einer ERK 1/2 Phosphorylierung nach TCDD-Belastung von fötalen Leberzellen. Obere Reihe: Nachweis der Phosphorylierung von ERK1/2 durch P-ERK1/2-Antikörper. Untere Reihe: Ladungskontrolle mit Gesamt-ERK1/2-Antikörper. 15 μ g Zellysate wurden in jeder Spur pro Zeitpunkt aufgetragen.

Die Abb. 3.16 zeigt einen typischen Blot dieser Untersuchung. Die mit DMSO behandelte Gruppe zeigte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein deutliches Fluoreszenzsignal für eine Phosphorylierung der Aminosäuren T 202 und Y204 der ERK. Erst nach 60 min nach TCDD-Belastung war eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung der ERK1/2 zu detektieren. Das Fluoreszenzsignal der ERK2-Bande war im Vergleich zur ERK1-Bande stärker.

Die in Gegenwart des AhR-Antagonisten 3'-M-4'-NF bestätigt AhR-abhängige Phosphorylierung des EGFR, konnte nicht auf die Aktivierung der nachgeschalteten ERK-Signalkaskade übertragen werden. Die zeitlich sehr späte ERK-Phosphorylierung weist auf eine AhR-unabhängigen und nicht primären Effekt durch die TCDD-Belastung hin.

Zusammenfassend zeigen die molekular und proteinbiochemischen Untersuchungen an fötalen Leberzellen,

- daß diese im Gegensatz zu adulten primären Zellen proliferieren
- daß diese AhR-regulierte CYP1A-Gene exprimieren, aber nicht Enzyme der Klasse CYP1B, CYP2B und CYP3A
- daß diese Zellen responsiv gegenüber Xenobiotika und Zytokinen sind
- und daß TCDD möglicher Weise über die Aktivierung des EGFR-MAPKinase-Signalweges einen Proliferationsreiz auf diese Zellen ausübt.

4 Diskussion

Umweltchemikalien stellen eine allgegenwärtige Quelle der Belastung für den Körper dar. Durch die Interaktion von Chemikalien mit zellulären Bestandteilen kommt es zur Auslösung differenzierter Signalkaskaden. Diese wirken direkt auf die Zellregulation oder auf die Expression bestimmter Gene. Bei diesen Ereignissen spielt, abhängig vom chemischen Charakter des Liganden, der AhR eine wichtige Rolle. Dabei wird die Wirkung des AhR auf die Zelle über vielfältige, meist unbekannte Mechanismen reguliert. Zu diesen Mechanismen gehört die Regulation der Transkription AhR-abhängiger Gene. Die Transkription als solche stellt bereits ein komplexes Geschehen dar und die Transkription AhR-abhängiger Gene kann letztlich nicht allein federführend durch den Akteur AhR reguliert werden. Als Gegenspieler steht in diesem Kontext der AhRR zur Diskussion. Transiente extrachromosomale Genexpressionsstudien in Zellkulturen weisen auf eine negative Rückkopplung des AhRR auf die Transkription AhR-abhängiger Gene hin (Baba et al., 2001; Evans et al., 2005; Karchner et al., 2002; Mimura et al., 1999). Aus diesem Grund war es von Interesse, die Expression des AhRR und seine Wirkung auf die Expression AhR-abhängiger Gene *in vivo* in adulten Geweben der Maus zu untersuchen. Ein mögliches Ausbalancieren der Wirkung des AhR durch einen konstitutiv präsenten AhRR wäre dabei denkbar.

4.1 Gewebeverteilung und Funktion des AhRR in C57BL/6- und AhR-defizienten Mäusen

Organspezifische Expression des *AhRR*

Der AhRR, wie auch der AhR und ARNT, gehören der Familie der bHLH/PAS-Transkriptionsfaktor-Protein an (Gu et al., 2000). AhRR und AhR dimerisieren mit ARNT und inhibieren bzw. initiieren die Transkription von AhR-abhängigen Genen (Mimura

et al., 1999). Die Expression des *AhRR* wurde bereits in unterschiedlichen Geweben der Maus (Mimura et al., 1999), des Zahnkärpflings (*Fundulus heteroclitus*) (Karchner et al., 2002), des Menschen (Fujita et al., 2002; Tsuchiya et al., 2003; Yamamoto et al., 2004) und der Ratte (Korkalainen et al., 2004; Nishihashi et al., 2006) untersucht.

Um einen möglichen Einfluß eines basal präsenten AhRR auf den AhR-Signalweg zu untersuchen, wurde die konstitutive Expression des *AhRR* in C57BL/6-Mäusen bestimmt (Bernshausen et al., 2006). Die *AhRR* mRNA-Expression wurde mittels der sensitiven Real-Time PCR in Gehirn, Herz, Niere, Leber, Milz, Lunge, Thymus und den Ovarien bzw. den Testes (Hoden) von C57BL/6- und AhR-defizienten Mäusen untersucht (Bernshausen et al., 2006). Im Vergleich zu den Ergebnissen von Mimura et al. (1999), der keine konstitutive Expression des *AhRR* mittels konventioneller PCR feststellen konnte, wurde eine basale Expression des *AhRR* in allen untersuchten Geweben gefunden. Dabei variierte die Expression in den untersuchten Geweben um bis zu dem Zehnfachen. Die höchste *AhRR* mRNA-Expression wurde im Herzen und nachfolgend im Gehirn gefunden. In den weiter untersuchten Geweben war die konstitutive Expression des *AhRR* sehr gering (Abb.3.1).

Ähnlich den Expressionsdifferenzen des *AhRR* in den unterschiedlichen Geweben der Maus, variiert in den anderen untersuchten Spezies die Expression in den unterschiedlichen Geweben (Fujita et al., 2002; Korkalainen et al., 2004; Nishihashi et al., 2006; Tsuchiya et al., 2003; Yamamoto et al., 2004). Vergleichbar zur Maus, ist die konstitutive *AhRR*-Expression der Ratte im Herzen am größten (Korkalainen et al., 2004). Neben der hohen Expression im Herzen ist der Gehalt an *AhRR* mRNA in den Testes hoch. Dies steht im Einklang zu einer hohen Expression in den menschlichen Hoden (Tsuchiya et al., 2003). Dem gegenüber ist die *AhRR* mRNA-Expression in der Maus gering, jedoch im Vergleich zu anderen Geweben der Maus ist diese, folgend auf Herz und Gehirn sehr hoch. Parallel zum Menschen (Tsuchiya et al., 2003) ist die *AhRR* mRNA-Expression in den Testes im Vergleich zu den Ovarien stärker, wie auch die der Nieren gegenüber der Lunge. In ihrer Gesamtheit zeigen die bekannten Literaturergebnisse (Baba et al., 2001; Bernshausen et al., 2006; Evans et al., 2005; Karchner et al., 2002; Korkalainen et al., 2004; Nishihashi et al., 2006; Tsuchiya et al., 2003; Yamamoto et al., 2004) eine speziesübergreifende und speziesspezifische, sowie gewebespezifische konstitutive *AhRR*-Expression in Vertebraten auf.

Kontrolle der *AhRR*-Expression

Die organspezifische basale Expression des *AhRR* konnte in dieser Arbeit angezeigt werden und in der Literatur wird eine AhR-abhängige Kontrolle der *AhRR* mRNA-Expression beschrieben. Die 5'-flankierende Region des *AhRR* weist drei funktionelle XRE in der Promoterregion auf. An diesen initiiert der ligandenaktivierte und ARNT-assoziierte AhR die Expression des *AhRR* (Baba et al., 2001).

Um den Einfluß des AhR auf die Regulation der basalen Expression des *AhRR* zu untersuchen, wurde erstmals die Expression der *AhRR* mRNA in unterschiedlichen Geweben von AhR-defizienten Mäusen bestimmt (Bernshausen et al., 2006). Die Ergebnisse zeigten deutlich, daß der AhR die konstitutive Expression des *AhRR* kontrolliert (Abb.3.2).

Der *AhRR* wurde in den untersuchten Geweben von AhR-defizienten Mäusen im Vergleich zu dem Wildtyp sehr gering konstitutiv exprimiert. Die Expression in Wildtyp-Mäusen ist um zwei bis drei Zehnerpotenzen höher (Abb.3.2). Der Vergleich zwischen den Expressionsprofilen der unterschiedlichen Gewebe von AhR-defizienten und Wildtyp-Mäusen weist ein unterschiedliches Muster auf. Dies könnte in der Beeinflussung von Co-Aktivatoren bzw. Co-Repressoren durch einen vorhandenen oder nicht-vorhandenen AhR begründet sein.

Die sehr geringe *AhRR* mRNA-Expression zeigt auf, daß die *AhRR*-Expression über den AhR kontrolliert wird und stützt die Betrachtung der XRE-abhängigen konstitutiven Expression des *AhRR*. Die XRE dienen als verstärkende Modulatoren der *AhRR*-Expression für eine mögliche physiologische Aufgabe des AhRR.

Die Tatsache, daß der *AhRR* in AhR-defizienten Mäusen transkribiert wird, deutet auf einen in gewissem Umfang zugänglichen und aktiven Promoter hin. In der 5'-flankierenden Region des *AhRR* sind drei GC-Elemente, sowie eine NF κ B-Bindungsstelle gefunden worden (Baba et al., 2001). Der Einfluß der NF κ B-Bindungsstelle wurde durch die Induzierbarkeit des *AhRR* in Anwesenheit von 12-*O*-Tetradecanoylphosphol-13-Acetat (TPA) bewiesen (Baba et al., 2001). Die GC-Elemente stellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 putative Bindungsstelle dar, die für die konstitutive und induzierbare Expression des *AhRR* eine wichtige Rolle spielen könnten (Haarmann-Stemmann und Abel, 2006). Haarmann-Stemmann et al. (2007) konnte durch Blockierung der GC-reichen Sequenzen mit Mithramycin A aufzeigen, daß die GC- und XRE-Elemente gemeinsam die basale und induzierbare Transkription des *AhRR* steuern.

Die Expression des *AhRR* in Abwesenheit von AhR evoziert eine physiologische Rolle des AhRR kontrastierend zur Repression des AhR-Signalwegs (Bernshausen et al., 2006).

Induzierbarkeit des *AhRR*

Die Abhängigkeit der *AhRR*-Expression von der Anwesenheit eines funktionellen AhR konnte gezeigt werden (Abb.3.2) und es sollte der Einfluß eines AhR-Agonisten auf die basale *AhRR*-Expression nachgewiesen werden.

Die Belastung mit dem AhR-Agonisten B[a]P führte zu einer gewebespezifischen *AhRR* mRNA-Expression (Abb.3.3). Eine signifikante *AhRR* mRNA-Induktion wurde in der Leber, den Ovarien, der Lunge und in der Milz detektiert. Im Thymus, welcher hoch sensitiv gegenüber dem AhR-Agonisten TCDD ist, wurde keine Induktion der *AhRR* mRNA durch B[a]P gefunden. Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Daten von Mimura et al. (1997), die eine geringe Induktion der *AhRR* mRNA im Thymus durch 3-Methycholanthren (3-MC) fanden. In den Organen Herz und Gehirn, mit einer hohen konstitutiven *AhRR* mRNA-Expression, vermochte B[a]P die basale Expression nicht zu übersteigern und es kam zu keiner Induktion der *AhRR* mRNA-Expression. Die Induktion ist von der vorgegebenen basalen Expression des *AhRR* abhängig und gewebespezifisch reguliert. Die Belastung mit den stärkeren AhR-Agonisten 3-MC und TCDD führte im Herzen von Mäusen und Ratten zu einer Erhöhung der *AhRR* mRNA-Expression (Korkalainen et al., 2004; Mimura et al., 1997). Diese Unterschiede im Vergleich zu den beschriebenen Ergebnissen dieser Arbeit, könnten in einer substratspezifischen Genregulation begründet sein, die bereits von anderen Genen beschrieben wurde (Gouedard et al., 2004; Matikainen et al., 2001). Alle Studien zeigen gemeinsam eine gewebespezifische Regulation der *AhRR*-Induktion auf.

Einfluß des AhRR auf die *CYP1A1*-Induktion

Für die mögliche Aufklärung der Funktion des AhRR wurde der Einfluß des AhRR auf die *CYP1A1*-Induktion studiert. Von den bekannten transienten Genexpressionsstudien wird davon ausgegangen, daß der AhRR eine repressive Funktion auf den AhR-Signalweg ausübt. Ferner soll nach *in vitro* -Befunden die *AhRR* Expressionshöhe die Induktion der *CYP1*-Genfamilie kontrollieren (Tsuchiya et al., 2003). Die Ergebnisse einer stark unterschiedlichen gewebespezifischen konstitutiven Expression des *AhRR* (Abb.3.1), auf der

einen Seite, und die nicht-parallele Induzierbarkeit von *AhRR* und *CYP1A1* (Abb.3.3, 3.4), auf der anderen Seite, weisen auf eine andere Funktion des AhRR gegenüber einer simplen „an und aus“ Regulation des AhR-Signalwegs hin. In der Leber wurde eine starke Induktion der *AhRR* mRNA nach 24 h B[a]P-Belastung parallel zu einer starken *CYP1A1*-Induktion festgestellt. Würde die Höhe der *AhRR*-Expression die *CYP1A1*-Expression regulieren, sollte es zu keiner starken *CYP1A1*-Induktion kommen. Da in der Studie keine Zeitkinetik gemacht wurde, ist aus den zugrundeliegenden Daten nicht ersichtlich, ob es durch den neugebildeten AhRR zu einer Erniedrigung der mRNA-Expression von *CYP1A1* kommen würde. Zusätzlich kommt es im Herzen mit einer hohen konstitutiven *AhRR* mRNA-Expression nach Belastung mit B[a]P zu einer starken *CYP1A1*-Induktion der mRNA-Expression. In dem Thymus hingegen, bleibt die *CYP1A1* mRNA-Expression, 24 h nach B[a]P-Belastung trotz einer geringen basalen *AhRR* mRNA-Expression aus. Diese Beobachtungen sprechen gegen eine hauptsächlichliche Funktion der negativen Rückkopplung des AhRR auf den AhR-Signalweg. Die gewebe-spezifische *AhRR*-Expressionshöhe reguliert nicht allein die AhR-abhängige Antwort auf AhR-Agonisten.

Weitere *in vivo*, wie auch *in vitro* -Befunde unterstreichen nicht unbedingt die Vorstellung einer negativen Rückkopplungsfunktion des AhRR auf AhR-abhängige Gene. Die CA-AhR-Maus mit einem konstitutiv aktiven AhR zeigt eine parallel erhöhte starke Expression von *AhRR*, *CYP1A1* und *CYP1A2* in den Organen Leber und Lunge gegenüber den Wildtyp-Tieren auf (Andersson et al., 2002). In Ratten und Mäusen führt TCDD-Belastung im Hypothalamus bzw. in der Hypophyse zu einer erhöhten *AhRR* mRNA-Expression, die von einer *CYP1A1* mRNA-Expression in diesen Geweben begleitet wird (Huang et al., 2002; Korkalainen et al., 2004). Zusätzlich führte die TCDD-Belastung in den Geweben Niere, Milz und Herz von Ratten zu einer Induktion der *AhRR* mRNA-Expression, die in keiner Relation mit der Induktion der *CYP1A1* mRNA-Expression stand (Korkalainen et al., 2004).

In vitro zeigten OMC-3-Zellen eine fünffach höhere konstitutive *AhRR* mRNA-Expression im Vergleich zu HepG2-Zellen auf, dennoch kam es in den OMC-3-Zellen zu einer doppelt so starken Induktion von *CYP1A1*-, *1A2*- und *1B1* mRNA-Expression nach TCDD-Belastung gegenüber den HepG2-Zellen (Tsuchiya et al., 2003). In anderen humanen Zelllinien, wie ACHN, A549 und HT-1197, mit einer niedrigen basalen *AhRR* mRNA-Expression kommt es weder nach TCDD- noch nach 3-MC-Belastung zu einer Induktion von AhR-abhängigen Genen (Tsuchiya et al., 2003).

Funktion des AhRR

Die *in vivo*-Ergebnisse in den adulten Tieren spiegeln nicht die genannten *in vitro*-Daten wieder und unterstützen nicht die Hypothese der repressiven Funktion des AhRR auf die Regulation AhR-abhängiger Gene. Es ist kein enger Zusammenhang zwischen der konstitutiven und induzierbaren Expression sowie der Responsivität von *CYP1A1* erkennbar. Entgegen der Befunde an der Zellkultur unterliegt *in vivo* die Induzierbarkeit von *CYP1A1* offensichtlich nicht einer Feedback-Regulation über den AhRR.

Die Ergebnisse und die beschriebenen anderer Autoren (Huang et al., 2002; Korkalainen et al., 2004; Tsuchiya et al., 2003) zeigen, daß die Transkription von AhR-abhängigen Mitgliedern der *CYP1*-Familie in Gegenwart einer erhöhten *AhRR* mRNA-Expression induziert werden. Bei der Einordnung von *in vitro*-Daten ist zu beachten, daß rekombinante Enzyme ein artifizielles Konstrukt darstellen. Hier besteht die Gefahr der voreiligen Interpretation der Ergebnisse. Die Rekombinanten liegen aufgrund ihrer Konstruktion im Überschuß in der Zelle vor und sind so im Gegensatz zur *in vivo*-Situation in der Lage, an Substrate mit niedriger Affinität zu binden. Das quantitative Vorkommen des Konstrukts beeinflußt direkt das komplexe System.

Die nachfolgenden Argumenten belegen zusätzlich, daß die Funktion des AhRR schwierig einzuordnen ist. So ist in CA-AhR-Mäuse, mit einen konstitutiv aktiven AhR, der *AhRR* im Magen sehr stark exprimiert und diese versterben sehr früh an malignen intestinalen Karzinomen (Andersson et al., 2002). Die Gründe für die adversen Effekte könnten auf den AhR, aber auch auf den AhRR zurück geführt werden. Zervix- und Ovarienkarzinom-Zelllinien weisen ebenfalls eine konstitutiv hohe *AhRR*-Expression auf, hingegen Hepato- und Adenokarzinom-Zelllinien nicht (Tsuchiya et al., 2003).

Der Einfluß des AhRR kann aufgrund der unterschiedlichen Transkriptionsstärke nur zelltypspezifisch sein und ist offensichtlich gering im Bezug auf eine repressive Funktion des AhRR auf die Regulation AhR-abhängiger Gene.

Aus dieser Konsequenz wurde nachfolgend die Expression von *AhR* und *AhRR* in fötalen Lebern der Maus untersucht, da eine bedeutende Rolle des AhR in der Leberentwicklung in der Literatur beschrieben wurde (Fernandez-Salguero et al., 1997; Mimura et al., 1997; Schmidt et al., 1996) und diese möglicherweise im Zusammenhang mit einer Funktion des AhRR stehen könnte.

4.2 Expression von *AhR* und *AhRR* während der Leberreifung

Die unentbehrliche Expression des *AhR* für die Leberentwicklung wurde in unabhängigen Studien mit *AhR*-defizienten Mäusen deutlich (Fernandez-Salguero et al., 1997; Mimura et al., 1997; Schmidt et al., 1996). Zusätzlich wurde eine zeitlich definierte *AhR*-Aktivität für eine normale Entwicklung beschrieben (Walisser et al., 2004). Diese Befunde werden durch die beobachtete gegensätzliche Expression von *AhR* und *AhRR* während der fötalen Leberentwicklung bestätigt (Abb.3.5).

Entscheidend dabei ist, daß die Expressionshöhe des *AhRR* gegenüber dem *AhR* während der untersuchten embryonalen Entwicklungsphase ab- und die Expression des *AhR* zunahm. Der Zuwachs der *AhR* mRNA stimmt mit den beschriebenen steigenden mRNA- und Proteinhöhe des *AhR* nach GD 13.5 überein (Abbott et al., 1995). Aufgrund der anfänglich geringen *AhR* mRNA-Expression ist es verführerisch von einer *AhR*-unabhängigen *AhRR* mRNA-Expression auszugehen. Eine sehr geringe *AhR*-unabhängige basale *AhRR* mRNA-Expression wurde in adulten *AhR*-defizienten Mäusen bereits in dieser Arbeit beschrieben (Bernshausen et al., 2006). In der 5'-flankierenden Region des *AhRR* wurden drei GC-Elemente, sowie eine NF κ B-Bindungsstelle gefunden (Baba et al., 2001), die für die konstitutive und frühe fötale Expression des *AhRR* eine wichtige Rolle spielen könnten.

Die Vermutung, daß der *AhRR* in der Leber zu einem frühen fötalen Entwicklungszeitpunkt funktionell aktiv sein könnte, wird durch die Ergebnisse des Anti-*AhRR* Immunoblots unterstützt (Abb.3.6). Die nur in der Kernextraktspur detektierte Bande um 75 kDa entspricht dem möglichen Molekulargewicht des *AhRR* bei einer Aminosäurelänge von 701 Aminosäuren und einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 110 Da je Aminosäure. Die zwei im Molekulargewicht geringen Banden könnten mögliche Spaltprodukte des *AhRR* darstellen. Deutlich spricht für einen aktiven *AhRR*, daß dieser zum Zeitpunkt GD 13.5 in der Maus nur nukleär lokalisiert ist.

Neuere Erkenntnisse begründen eine physiologische Relevanz des *AhRR* in der Organentwicklung. So führt die Bindung des *AhRR* an die Promoterregion des Oncogens *c-myc* zu einer erhöhten mRNA- und Protein-Expression (Yang et al., 2005). *c-myc* ist an der Regulation von Zellwachstum und Apoptose beteiligt.

Die hohe Expression des *AhRR* während der fötalen Entwicklung dient vermutlich der Unterdrückung der konstitutive Expression bestimmter CYP450-Formen und würde

deren späte Expression erst zu spätem Entwicklungszeitpunkt erklären. Für das adulte Tier hingegen ist die Expression der CYP450-Isoformen wichtig und die Expression des Repressors reprimiert.

Es liegt nahe, daß die Unterdrückung der CYP450-Expression eine protektive Funktion darstellt. Bei der Aktivität von CYP450-abhängigen Monooxygenasen kann es zu einer verstärkten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kommen. Dies führt unter anderem zu DNA-Addukten, Zellmembranschäden, Proteinmodifizierung und Enzyminaktivierung, was letztendlich zum Tod eines Organismus führen kann.

Im Zusammenhang mit einer erhöhten ROS-Anreicherung wird eine gesteigerte männliche Fertilität, eine adverse Embryonalentwicklung und eine erhöhte Abortrate beschrieben (Baker und Aitken, 2005). Rizzo et al. (2007) beschreiben für *Xenopus laevis* Embryonen eine entwicklungsspezifische Zunahme der Enzymausstattung zur Abwehr von ROS. Die Autoren vermuten eine frühe genetische und eine späte umweltbedingte Regulation der antioxidativen Abwehr. In dieses Bild würde der AhRR als früher Unterdrücker für die Entstehung von ROS während der sensiblen Entwicklungsstadien passen.

Auch im adulten Organismus kann ein ROS-protektiver Hintergrund für die hohe konstitutive Expression des AhRR verantwortlich sein. So könnte hypothetisch, die für die Maus, die Ratte und den Menschen beschriebene hohe basale mRNA-Expression des *AhRR* in den Hoden (Bernshausen et al., 2006; Korkalainen et al., 2004; Tsuchiya et al., 2003) eine Spermienmißbildung durch oxidativen Stress verhindern (Gupta et al., 2006).

Die Daten der fötalen AhRR-Expression und die der Gewebeverteilung und Funktion des AhRR (Bernshausen et al., 2006) zeigen, daß die Modulation AhR-regulierter Gene durch den AhRR kein allgemeingültiges Prinzip darstellt, wie zunächst angenommen wurde (Mimura et al., 1999).

Zusätzlich kann die gegenläufige Änderung im Expressionsprofil von *AhR* und *AhRR* zur entwicklungsspezifischen Charakterisierung der Leber herangezogen werden, da der Grad der Reifung der Leber durch leber- und entwicklungsabhängige Gene charakterisiert werden kann (Derman et al., 1981).

Die direkte oder indirekte Modulation der Zellregulation durch Einflußnahme des AhR auf andere Transkriptionsfaktoren (Ge und Elferink, 1998), auf Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren (Nguyen et al., 1999; Wang und Hankinson, 2002) und der Veränderung von Signal-Transduktionskaskaden (Carlson und Perdew, 2002; Tan et al., 2004) wurde in zahlreichen Studien in den letzten zehn Jahren deutlich. In diesen Studien wurde bisher

der AhRR außer Acht gelassen. Dabei könnte der AhRR eine wichtige Rolle bei der AhR-Aktivität spielen.

Um den Einfluß von AhR und AhR-abhängiger Gene auf das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung detaillierter zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein leberspezifisches *in vitro*-System etabliert.

4.3 Kultivierung primärer fötaler muriner Leberzellen

In den frühen Abschnitten der Embryonalentwicklung sind Maus und Mensch kaum voneinander zu unterscheiden. Prinzipielle Abläufe wie Oogenese und Spermatogenese, Befruchtung und Organentwicklung sind vergleichbar (Seyffert et al., 1998). Ein stabiles *in vitro*-System könnte somit Effekte im Menschen verstehen lernen und Vorhersagen für den Menschen treffen.

Über die Isolation fötaler Leberzellen zu dem frühen Entwicklungszeitpunkt GD 13.5, konnte ein breites Entwicklungs- und Differenzierungsspektrum betrachtet werden. Zu diesem frühen Zeitpunkt der Leberreifeung besteht die Leber hauptsächlich aus bipotenten hepatischen Progenitorzellen, den Hepatoblasten (Suzuki et al., 2000). Erst später kommt es zur entscheidenden Differenzierung zu Hepatozyten und Gallengang Epithelzellen (Houssaint, 1980; LeDouarin, 1975).

Eine wesentliche Voraussetzung für den Einsatz von *in vitro*-Kulturmodellen als Alternative zum Tierversuch ist der Erhalt bzw. das Erreichen eines definierten Differenzierungsgrades der Zellen. Dazu ist eine möglichst genaue Annäherung an die *in vivo*-Verhältnisse der Zellen im intakten Organ erforderlich.

Die Differenzierungsschritte während der Organogenese der Leber sind bekannt und beschrieben (Hogan et al., 1994; Kamiya et al., 1999; Zhao und Duncan, 2005), aber die verantwortlichen Kontrollmechanismen sind noch weitestgehend unbekannt (Spagnoli et al., 1998). Dabei können Umweltfaktoren eine entscheidende Rolle in der Zelldifferenzierung und -entwicklung spielen. Zu diesen Effektoren gehören biologisch aktive Stoffe wie Zytokine, die extrazelluläre Matrix und Zell-Zell-Kontakte (Spagnoli et al., 1998).

Bei der Realisierung des *in vitro*-System wurden diese Hintergründe beachtet. In den Vorversuchen konnte die Kultivierung der Leberzellen umgesetzt werden. Dazu wurden geeignete Supplemente und eine geeignete extrazelluläre Matrix bereitgestellt, ähnlich

wie in bekannten Studien (Inoue et al., 2002; Kamiya et al., 2002; Spagnoli et al., 1998; Suzuki et al., 2000, 2003), umgesetzt werden.

Die *in vitro*-Leberzellkultur wurde in einem statischen Zellsystem verwirklicht. Dieses hat gegenüber isolierten Hepatozyten in Suspension mit einer sehr geringen Lebensdauer von wenigen Stunden (Härtter, 2000) den Vorteil, daß die Zellen über einen längeren Zeitraum kultiviert werden können. In diesem statischen System konnten die Leberzellen zwei Wochen in Kultur gehalten werden.

Die kultivierten Leberzellen stellen eine gemischte Population u.a. aus Stammzellen, Progenitorzellen, Endothelzellen und an Fibroblasten dar. Ähnlich wie *in vivo* stehen diese nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell sehr eng miteinander in Wechselwirkung. Dies hat den Vorteil, daß diese Zellen sich wie *in vivo* untereinander über die Sekretion von biologisch aktiven Stoffen beeinflussen können.

Nachteilig bei dieser Form der heterogenen Zellkultivierung ist eine mögliche Überwucherung durch Fibroblasten. Fibroblasten proliferieren bei gängigen Kulturbedingungen sehr schnell und verfügen gegenüber Hepatozyten über ein anderes metabolisches Profil. Dies würde die metabolische Analyse verfälschen. Die Überwucherung durch Fibroblasten konnte durch Zusatz von D-Valin zum Kulturmedium verhindert werden. Dies ist in einer unterschiedlichen Präsenz von D-Aminosäureoxidasen in Epithelzellen und Fibroblasten begründet (Mertens et al., 1998; Sun et al., 1979).

Ein Nachteil der Leberzellkultur ist ihre zeitlich begrenzte Vitalität. Dieser Nachteil wäre durch eine Immortalisierung der Zellen zu überwinden. Immortalisierte Hepatozyten sind aber in Kultur sehr instabil und zeigten meist eine artifizielle Expression Cytochrom P450-abhängiger Monooxygenasen (Härtter, 2000; Pfeifer et al., 1993). Eine Alternative für die längerfristige Nutzung von primären Leberzellen und für die Reduzierung lebenden Ausgangsmaterials, sowie eine zeitliche Unabhängigkeit, stellt die Kryokonservierung dar. Die Vorversuche zeigten aber für die aufgetauten Leberzellen eine verlängerte Reorganisationsphase nach Re-Einsaat der Zellen. Daher wurde von der Kryokonservierung abgesehen.

Die morphologische Charakterisierung der Leberzellkultur zeigte für Hepatozyten einen charakteristischen monolayeren epithelialen Zellverband an (Abb.3.8). Die Leberzellen zeichneten sich des Weiteren durch eine polygonale Zellstruktur und ein geringes Kern-Zytoplasma-Verhältnis aus (Zwicky et al., 2000). Ferner waren diese für Hepatozyten typisch mehrkernig, wuchsen in Kolonien und wiesen ein stark granuläres Zytoplasma auf.

Eine Differenzierung der Zellen konnte morphologisch im Lichtmikroskop über den Zeitraum der Kultivierung beobachtet werden (Abb. 3.7). Die Zellen zeigten eine zonale Differenzierung, die sich in ihrer Zellgröße und May-Grünwald-Giemsa-Anfärbung unterschieden (Abb.3.8). Diese Zell Cluster wiesen ähnlich zu ausdifferenzierten Hepatozyten Zell-Zell-Kontakte auf sowie ein granuläres Zytosol und klar abgerundete Zellkerne (Kamiya et al., 1999). Zusätzlich zeigten diese Zellen ein Domänenwachstum auf.

Immunchemisch konnte der Hepatozytenmarker Albumin fluoreszenzmikroskopisch und im Western-Blot nachgewiesen werden (Abb.3.9). Über den Nachweis von Albumin-synthetisierenden Zellen konnten 70 % der Zellen als Hepatozyten identifiziert werden. Dieser Prozentsatz entspricht dem literaturbekannten parenchymalen Anteil von Hepatozyten in der Leber (Deschel, 2005; Zwicky et al., 2000).

Fötale Leberzellen proliferieren gegenüber adulten Zellen über einen längeren Zeitraum in Kultur und ermöglichen die Analyse möglicher Interferenzen des AhR mit dem Zellwachstum und der Zelldifferenzierung. Diese Eigenschaft konnte lichtmikroskopisch gezeigt und mittels CellTiter-Blue-Kit (Promega, Mannheim) (Ahmed et al., 1994) quantifiziert werden. Über den untersuchten Zeitverlauf von 78 h zeigt die Kultur ein exponentielles Wachstum auf. Die bestimmte Generationszeit betrug 24 h für die etablierte Leberzellkultur.

Um die Responsivität des etablierten Systems gegenüber Zytokinen zu studieren, wurde der Einfluß von Oncostatin M (OSM) auf das Zellwachstum untersucht. Oncostatin M, ein Zytokin der Interleukin-6-Familie, induziert die Differenzierung zu Hepatozyten (Kamiya et al., 1999). Eine Differenzierung geht dabei mit einer verringerten Proliferation einher. Es zeigte sich, daß die Behandlung mit OSM in einer dezimierten Proliferation resultiert, die zu einer um das 1,3-fach verlängerten Generationszeit von 36 h führte (Abb.3.10).

Neben der morphologischen Charakterisierung wurde die metabolische Aktivität der fötalen Leberzellen untersucht. Der früheste beschriebene Zeitpunkt der Induzierbarkeit der CYP450-abhängigen Monooxygenasen ist das Acht-Zell-Stadium in der Blastozystenphase (Filler und Kimberly, 1981). Dieser Zeitpunkt stimmt mit dem frühesten beschriebenen Zeitpunkt der AhR-Expression überein (Peters und Wiley, 1995). In Nagetieren entwickelt sich eine nennenswerte Monooxygenaseaktivität erst um die Geburt (Schulz, 2006). Des Weiteren ist die CYP450-abhängige Monooxygenaseausstattung abhängig von dem Entwicklungsstatus (Schulz und Neubert, 1994). Mittels Genexpressionsanalyse

konnte eine durch Xenobiotika induzierte Initiation der Genexpression AhR-abhängiger Gene im etablierten *in vivo*-System nachgewiesen werden. Dabei war die Stärke der AhR-induzierten Expression abhängig von der Affinität des Agonisten zum Rezeptor (Shimada et al., 2002; Zhou und Gasiewicz, 2003).

Die Belastung mit 10 nM TCDD führte zu einer stärkeren Induktion der mRNA Expression der untersuchten Genen gegenüber der Belastung mit 10 μ M B[a]P unter identischen Kulturbedingungen (Abb.3.11). Unabhängig vom Induktor war im Vergleich der CYP1A-Formen *1A1* und *1A2*, die *CYP1A1*-Induktion gegenüber der Kontrolle um ein vielfaches höher gegenüber der *CYP1A2* Induktion. Begründet ist dies in der bereits hohen basalen Expression von *CYP1A2*. *CYP1A2* stellt die prominent exprimierte CYP1A-Isoform in der Leber dar (Sonnier und Cresteil, 1998). Identisch zu der Induktion der mRNA-Expression in der Leber adulter C57BL/6 Mäuse (Abel et al., 1996), ist die *CYP1B1*-Induktion in den kultivierten fötalen Leberzellen gegenüber der *CYP1A1* mRNA-Expression geringer. Die unterschiedliche Induzierbarkeit ist dabei nicht über die unterschiedliche Gesamt-Anzahl an XRE-Bindungsstellen in der Promoterregion der Gene zu erklären. Das humane *CYP1B1*-Gen verfügt über neun XRE-Bindungsstellen in der Promoterregion, wovon nur drei funktionell aktiv sind (Tang et al., 1996). Die Transkription von *CYP1A1* und *CYP1A2* wird über eine gemeinsame bidirektionale Region gesteuert (Ueda et al., 2006), dennoch zeigten sich Unterschiede in der konstitutiven, wie auch induzierten mRNA-Expression.

Andere *CYP2B*- und *CYP3A*- Formen, die über den nuklearen Pregnan-X-Rezeptor (PXR) bzw. über den konstitutiven Androstan-Rezeptor (CAR) reguliert werden (Maglich et al., 2002), konnten nicht detektiert werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß nach einer Phase des reorganisierens der Hepatozyten morphologische Charakteristika und spezifische Funktionen der Zellen erhalten bleiben. Darunter die Albuminsynthese und spezifische Cytochrom-P450-Aktivitäten. Eine wissenschaftliche und wirtschaftliche Anwendung für die pharmazeutische und auch chemische Industrie ergeben sich beispielsweise für Studien zum Metabolitenmuster, zu Arzneimittelinteraktionen, zur Enzyminduktion oder zum first pass effect von Pharmaka und Stoffen.

4.4 Einfluß des AhR und AhR-Agonisten auf die Zellregulation in Leberzellen

Die direkte oder indirekte Modulation der Zellregulation durch Einflussnahme des AhR und AhR-Agonisten wurde in zahlreichen Studien deutlich, diese konnten aber die Mechanismen nicht befriedigend aufklären (Carlson und Perdew, 2002; Döhr et al., 1994; Ge und Elferink, 1998; Nguyen et al., 1999; Tan et al., 2004; Vogel und Abel, 1995; Wang und Hankinson, 2002).

Für die Aufklärung der tumorpromovierenden Wirkung von TCDD auf die Nagerleber (Pitot et al., 1980) wurde das etablierte *in vitro*-System genutzt, da es sich gegenüber Xenobiotika und Zytokinen responsiv zeigte (Abb.3.11 - 3.10).

Primäre Hepatozyten treten durch Mitogene, wie EGF, von der G₀- in die G₁- Phase des Zellzyklus ein (Michalopoulos, 1990). TCDD wird eine Mitogen-mimikrierende Wirkung zugesprochen (Davis et al., 2000, 2001; Tannheimer et al., 1998). In der primären fötalen murinen Leberzellkultur kam es nach Belastung mit 10 nM TCDD zu einer signifikant erhöhten DNA-Syntheserate um 31% (Abb.3.12) und folglich zu einem Übergang der Zellen von der G₀- über die G₁- in die S-Phase des Zellzyklus. Die erhöhte DNA-Syntheserate ist ein Ausdruck der gesteigerten TCDD-induzierten Proliferation.

Für die Mechanismen, über die TCDD Leberzellen zur Proliferation anregt, wird eine Beteiligung von Kofaktoren, als auch eine Hemmung der Apoptose in Betracht gezogen (Schrenk et al., 1992; Schwarz et al., 2000). Bekannt ist aber die Niederregulierung des EGFR durch Zugabe von TCDD (Sewall et al., 1995) und, daß der EGFR in stark proliferierenden Zellen im Zellkern lokalisiert ist (Lin et al., 2001).

Da der Mitogen-mimikrierende Effekt von TCDD auf die Zellproliferation bestätigt werden konnte, wäre ein Zusammenhang mit dem EGFR nahliegend. Resultierend aus dieser Annahme wurde eine Aktivierung des EGFR nach TCDD-Belastung in den kultivierten fötalen Leberzellen untersucht.

Die Aktivierung des EGFR ist durch Belastung mit 10 nM TCDD bereits nach kürzester Zeit immunzytochemisch nachweisbar. Es kam 5 min nach der TCDD-Belastung zu einer transienten perinukleären Lokalisation des EGFR (Abb.3.13). Eine EGF-induzierte transiente nukleäre EGFR-Internalisierung erfolgt ebenfalls sehr rasch nach 5 min (Lin et al., 2001). Die TCDD-induzierte perinukleäre EGFR-Lokalisierung stimmt zeitlich mit der EGF-stimulierten überein und stellt die erste immunzytochemisch beschriebene perinukleäre Lokalisierung des EGFR nach TCDD-Belastung dar.

Daraufhin wurde geprüft, ob die TCDD-initiierte EGFR-Internalisierung durch die Beteiligung des AhR beeinflusst sein könnte (Enan und Matsumura, 1996). Die Aktivierung des EGFR ist an die Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren gekoppelt und über Tyrosin-Phosphat-Kinasen vermittelt. Die Phosphorylierung der Aminosäure Tyrosin 845 (Y845) des EGFR wird durch die AhR-assoziierte Tyrosin-Phosphat-Kinase c-Src-spezifisch phosphoryliert (Moro et al., 2002; Sato et al., 2003; Stover et al., 1995). Tice et al. (1999) zeigten, daß die spezifische Phosphorylierung an Y845 des EGFR für die DNA-Synthese nötig ist.

Um eine mögliche AhR-assoziierte Phosphorylierung des EGFR zu prüfen, wurde der Phosphorylierungsstatus von Y845 des EGFR nach TCDD-Belastung immunchemisch untersucht. Die immunchemischen Ergebnisse zeigten eine TCDD-stimuliert transiente Phosphorylierung der Aminosäure Y845 des EGFR, die zeitlich mit der perinukleären EGFR-Lokalisation korreliert (Abb.3.14).

In Gegenwart des c-Src-spezifischen Inhibitor PP2 wird die Phosphorylierung von Y845 des EGFR durch den Stimulus EGF inhibiert (Sato et al., 2003). Ferner konnten Zusammenhänge zwischen TCDD und c-Src bereits gefunden werden. Der c-Src-Inhibitor Geldanamycin reprimiert eine TCDD-induzierte DNA-Synthese (Köhle et al., 1999), sowie eine TCDD-induzierte Cox-2 Induktion (Vogel et al., 2000). Nachfolgend wurde geprüft, ob die Phosphorylierung der Aminosäure Y845 des EGFR AhR-abhängig vermittelt wird.

Durch Ausbleiben der TCDD-induzierten Phosphorylierung der Aminosäure Y845 des EGFR in Gegenwart des spezifischen AhR-Antagonisten 3'-M-4'-NF (Lu et al., 1995) konnte bestätigt werden, daß eine AhR-abhängige Phosphorylierung der Aminosäure Y845 des EGFR vorliegt (Abb.3.15).

Die AhR-abhängige Signalwirkung auf den EGFR ist über ein AhR-assoziiertes Protein im AhR-Multi-Protein-Komplex initiiert. Der TCDD-beeinflußte transiente nukleäre EGFR-Lokalisierung und -Phosphorylierung der Aminosäure Y845 ist AhR-abhängig vermittelt, aber ARNT-unabhängig. Es können zwei unabhängige AhR-Signalwege beschrieben werden, ein ARNT-abhängiger und ein ARNT-unabhängiger Weg.

In diesem Kontext stellt sich die Frage inwieweit auf den EGFR nachfolgende Signalwege von der AhR-abhängigen Aktivierung des EGFR betroffen sind.

Die Ergebnisse einiger Autoren deuteten zum Zeitpunkt der Studie auf eine EGFR nachfolgende Aktivierung der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) ERK hin (Davis et al., 2001; Enan et al., 1998a,b; Jyonouchi et al., 1999). MAPK werden durch

unterschiedliche Stimuli beeinflusst. Die prominentesten MAPK sind wachstumsfaktorinduzierte ERK und die streßinduzierten p38 und JNK. Die MAPK werden über andere MAPKKK-MAPKK phosphoryliert und phosphorylieren ihrerseits Transkriptionsfaktoren und initiieren die Regulation abhängiger Gene (Tan et al., 2004).

Durch Schlessinger und Ullrich (1992) ist bekannt, daß die Aktivierung des c-Src/Ras/ERK-Signalwegs zu Zellwachstum führt. Darüber hinaus führt TCDD in primären Primaten Endo-cervical-Epithelzellen zu c-Src- und ERK-Aktivierung (Enan et al., 1998b). Ferner kommt es nur im Wildtyp-Mäusen nach TCDD-Belastung zur Aktivierung beider ERK (Enan et al., 1998a). Dies gilt nicht bei c-Src-defizienten Mäusen (Enan et al., 1998a). Von humanen Epithelzellen ist bekannt, daß durch den AhR-Agonisten B[a]P die ERK-Aktivität stimuliert wird (Jyonouchi et al., 1999).

Um einen Zusammenhang zwischen der AhR-abhängigen TCDD-induzierten Phosphorylierung des EGFR und einer ERK-Phosphorylierung zu begründen, wurde der Einfluß von TCDD immunchemisch untersucht. Durch TCDD kommt es erst 60 min nach Belastung zu einer späten Phosphorylierung der ERK (Abb.3.16). Bei einer Mitogenmimikrierenden Wirkung von TCDD wäre eine frühe Phosphorylierung der ERK zu erwarten, ähnlich derer eines natürlichen Mitogens.

Auch Burdick et al. (2003) kritisiert das späte Auftreten von Phosphorylierungssignalen von Akt und ERK nach B[a]P-Chinon-Belastung gegenüber einer stärkeren Phosphorylierung nach bereits 15 min durch den Induktor EGF.

Auch in dieser Arbeit, sowie in den oben genannten Studien, kommt es erst zeitlich spät, nach 60 min, zu einer deutlichen ERK-Phosphorylierung. Dies läßt vermuten, daß die zeitlich späte ERK-Phosphorylierung kein primärer Effekt der TCDD-Behandlung darstellt. Die späte ERK-Phosphorylierung könnte eine autokrine Schleife der EGFR-Aktivierung darstellen, die nicht mit der ligandenabhängigen Aktivierung korreliert. Dies würde die Beobachtungen von Davis et al. (2001) stützen, bei denen die Autoren von einer TCDD-induzierten TGF- α -vermittelten ERK- und Akt-Phosphorylierung ausgehen.

Die Ergebnisse zeigen, daß für das Verständnis der Aktivierung möglicher Signalkaskaden durch die AhR-medierte Aktivierung des EGFR, eine zeitliche Betrachtung der auftretenden Effekte sehr wichtig ist. Die zeitnah erfolgte EGFR-Internalisierung und -Phosphorylierung nach TCDD-Belastung stellen eine primäre und AhR-abhängige Wirkung dar. Die zeitlich späte Phosphorylierung der ERK weist auf ein sekundäres Ereignis hin.

Der Hintergrund für das spätere Ereignis konnte in dieser Arbeit experimentell nicht aufgeklärt werden. In der Literatur finden sich aber zahlreiche Hinweise für eine mögliche Deutung dieser Effekte. Diese beruhen auf der Anreicherung von ROS und/oder einer Aktivierung eines EGFR-Liganden.

Die ligandenabhängige EGFR-Aktivierung ist Stimuli- wie auch Zelltyp-spezifisch. Die Aktivierung von Vorläufer-EGFR-Liganden erfolgt Metalloprotease-abhängig über Protein Kinase C (PKC), Kalziumeinfluß oder Tyrosin-Phosphat-Kinasen (Zhao et al., 2004). Die TCDD-abhängige PKC- und Tyrosin-Phosphat-Kinasen-Aktivierung wurde mehrmals beschrieben (Bombick et al., 1988 u. Referenzen in Blankenship und Matsu-mura, 1997).

Eine Metalloprotease-Aktivierung via AhR-assoziertes Protein ist bisher nicht bekannt, aber auch nicht auszuschließen. Es ist aber bekannt, daß TCDD AhR-abhängig die Expression der *Matrix-Metalloproteinase-1* (*MMP-1*) in Keratinozyten erhöht (Murphy et al., 2004). Neben einer veränderten *MMP-1*-Expression wurde eine TCDD-dosisabhängige Induktion von *TGF- α* beschrieben (Vogel und Abel, 1995). Die TCDD-abhängige erhöhte *TGF- α* Transkriptmenge resultiert aus einer post-transkriptionellen Stabilisierung der mRNA und spiegelt sich in einer erhöhten Proteinmenge wieder (Gaido et al., 1992).

Einige Studien weisen auf eine ROS-vermittelte ERK-Phosphorylierung hin (Burdick et al., 2003; Fialkow et al., 1994; Lee et al., 2005; Lund et al., 2005). ROS können auf vielfältige Art und Weise die Zellregulation beeinflussen. Etwa durch DNA-Schädigung, Freisetzung von Zytokinen sowie die Modellierung von MAPK.

ROS können bei der Metabolisierung von endo- und exogenen Substanzen durch CYP450-Monooxygenasen entstehen. So wird bei der TCDD-induzierten AhR-abhängigen CYP450-Monooxygenasen Induktion der Ligand nicht verstoffwechselt, sondern es können endogene Substrate umgesetzt werden. Eine mögliche Konsequenz könnte die Hydroxylierung von 17 β -Estradiol sein, bei der mögliche ROS entstehen könnten (Wyde et al., 2001). Vogel et al. (1997) gehen von einer TCDD-abhängigen IL-1 β -induzierten ROS-Anreicherung aus. *IL-1 β* wird in der Leber der Maus AhR-abhängig durch TCDD-induziert und stimuliert hepatische Endothelzellen zur ROS-Freisetzung (Vogel et al., 1997).

Die AhR-abhängige Induktion der Genexpression von *MMP-1* (Murphy et al., 2004) und *IL-1 β* (Vogel et al., 1997) ist zeitlich ein zu langdauernder Prozeß, um die beobachtete ERK-Phosphorylierung 60 min nach TCDD-Behandlung zu erklären (Abb.3.16).

Boverhof et al. (2005) beschreibt eine direkte ROS-Anreicherung durch TCDD. Dies würde eine ROS-induzierte EGFR-Aktivierung evozieren (Carpenter, 1999). Zhao et al. (2004) beschreiben eine zeitgleiche EGFR-Aktivierung und Metalloprotease-abhängige TGF- α -Freisetzung 2 min nach Zugabe des Stimulus, was zeitlich mit den Ergebnissen dieser Arbeit korreliert (Abb.3.13, 3.14). Blanchet et al. (2004) untermauern die ROS-induzierte EGFR-Aktivierung in ihren Ergebnissen mit Hilfe des Antioxidans N-Acetyl-Cystein (NAC) bzw. eines Anti-EGFR-Antikörpers. In Gegenwart von NAC oder des Anti-EGFR-Antikörpers kommt es zu keiner Freisetzung des EGFR-Liganden nach Applikation des ROS-induzierenden Stimulus (Blanchet et al., 2004).

Die eruierte ERK-Phosphorylierung zu späteren Zeitpunkten (Burdick et al., 2003; Davis et al., 2003, 2001; Enan et al., 1998a) deduziert sich aus einer Mitogen-vermittelten autokrinen EGFR-Aktivierung. Dabei wird die autokrine Wirkung durch die TCDD-abhängige Expression von TGF- α und IL-1 β , sowie einer vermutlichen IL-1 β -induzierten ROS-Anreicherung aufrechterhalten. Die beobachtete ERK-Phosphorylierung 60 min nach TCDD-Behandlung kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht hinreichend erklärt werden.

Unabhängig davon weist eine Internalisierung und perinukleäre Akkumulation des EGFR auf einen bisher nicht beschriebenen Signalweg der Genaktivierung durch AhR-Agonisten hin. Der nukleär lokalisierte EGFR initiiert als Transkriptionsfaktor die Transkription von Proliferation verantwortlichen Genen (Lin et al., 2001). Dabei bindet der EGFR an AT-reichen Sequenzen des *Zyklin D1* und stimuliert dessen Transkription (Lin et al., 2001). Zyklin D1 hält eine wichtige Schlüsselfunktion in der Zellzyklusregulation inne. Die Expression von *Zyklin D1* (wie die der anderen Zykline) oszilliert während des Zellzyklus und ist maximal in der späten G₁-Phase. Als regulatorische Untereinheit des Zyklin/Cdk-Komplexes aktiviert diese die assoziierten Zyklin-abhängigen Kinasen (Cdk) Cdk4 und Cdk6. Die Aktivierung des Zyklin D1/Cdk4,6-Komplexes führt zur Hyperphosphorylierung und Inaktivierung des Retinoblastomproteins (Rb) und letztlich zur Progression des Zellzyklus in die S-Phase. Phosphoryliertes Rb fungiert als transkriptioneller Repressor durch Bindung an die E2F-Aktivierungsdomäne von S-Phase spezifischen Genen. Die TCDD-vermittelte Progression in die S-Phase wurde in dieser Arbeit bereits beschreiben und diskutiert, wodurch sich der Kreis wieder schließt (Abb.3.12).

AhR-Agonisten können direkt über die Internalisierung und nukleäre Akkumulation des EGFR die Progression des Zellzyklus in die S-Phase initiieren, ohne Umwege über MAPK-Signalwege.

Durch die Anwesenheit eines AhR-Agonisten und die Adaptation an diesen, wird die Homöostase der Zellregulation gestört. Die zugrundeliegenden Mechanismen mit denen TCDD die Proliferation von Leberzellen anregt, verlaufen auf mehreren Ebenen. Zu diesen Ebenen gehören die Aktivierung von Kinasen oder Transkriptionsfaktoren, die Phosphorylierung von Proteinen und die Transkriptionsregulation unterschiedlicher Zytokine. Diese Effekte sind direkt oder indirekt AhR-abhängig.

Zu den TCDD-induzierten direkten AhR-abhängigen und ARNT-unabhängigen Effekten auf die Proliferation von Leberzellen beruht die Phosphorylierung und eine nukleäre Internalisierung des EGFR, die zu einer möglichen Expression von *Zyklin D1* führt. AhR- und ARNT-abhängig erfolgt die Initiation der Transkription von Zytokinen. Die AhR-abhängigen und auf transkriptioneller Ebene verlaufenden Mechanismen vermitteln die zeitlich späte und Mitogen-vermittelte Wirkung auf die Proliferation.

Die zum Stimulus zeitnahe indirekt AhR-abhängigen Wirkungen der TCDD-induzierten Zellproliferation stellen eine mögliche ROS-Anreicherung und Mitogen-vermittelte auto-krine EGFR-Aktivierung dar. Diese Prozesse verlaufen auf der Ebene der Aktivierung von Kinasen und der Phosphorylierung von Proteinen.

Die beschriebenen und diskutierten Ergebnisse klären die AhR-abhängige Zellregulation ein wenig auf (Abb.4.1), wobei ein möglicher zusätzlicher AhR-abhängiger und ARNT-unabhängiger Weg der Transkriptionsinitiation beschrieben werden konnte. Durch die gewonnenen Ergebnisse und deren Interpretation konnte eine wichtige Bedeutung der AhR an diesen Prozessen aufgelöst und dargestellt werden.

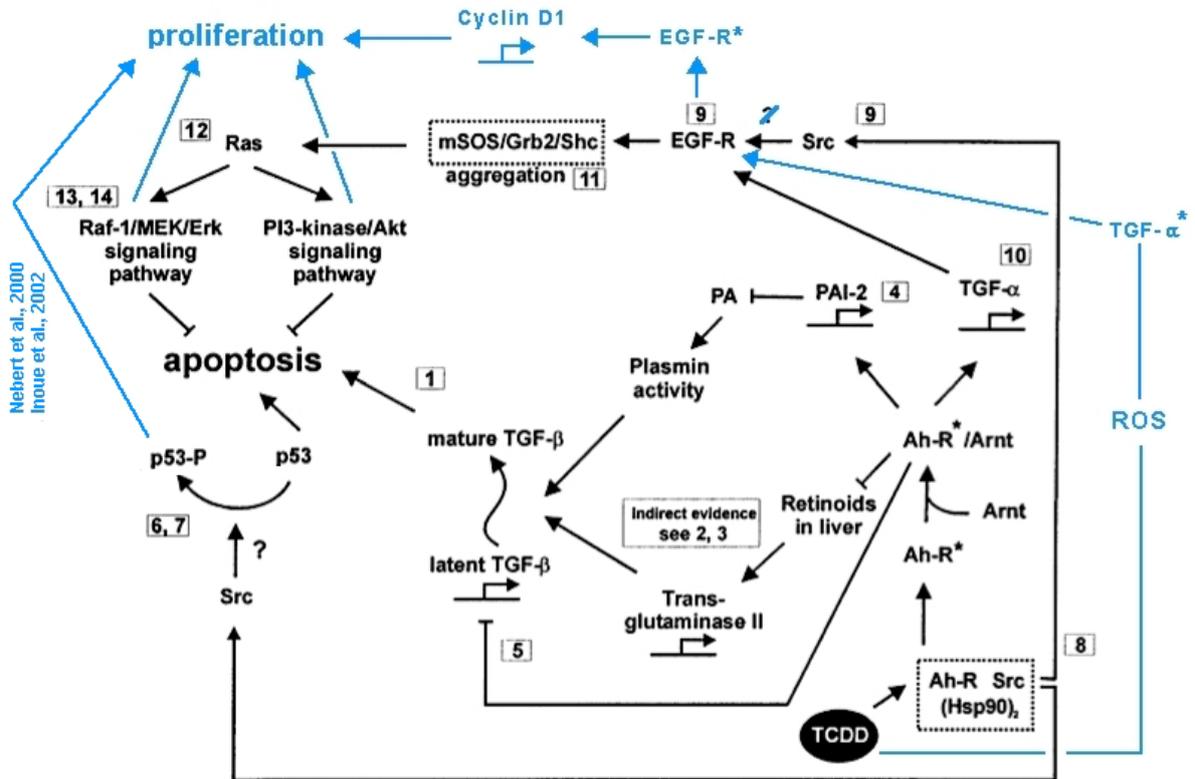


Abb. 4.1: Schema der AhR-abhängigen Mechanismen der hepatischen Zellregulation. Abgeändert nach Schwarz et al. (2000). Blaue Änderungen sind in dieser Arbeit oder den Referenzen erläutert. 1-13 Referenzen in Schwarz et al. (2000).

4.5 Einordnung dieser Arbeit

Für die Umsetzung des REACH-Programms (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals) der EU werden *in vitro*-Methoden immer wichtiger für eine Reduzierung der hohen Anzahl benötigter Versuchstiere. Dabei könnte das in dieser Arbeit etablierte fötale Leberzellensystem als mögliches Screening-System Verwendung finden. Die kultivierten fötalen Leberzellen proliferieren in Kultur und ermöglichen die Untersuchung des Einflusses von Chemikalien auf das Zellwachstum. Des Weiteren ist durch die metabolische Kompetenz der kultivierten fötalen Leberzellen eine Identifizierung pro-toxischer Testsubstanzen möglich.

Die nähere Charakterisierung der Interaktion von AhR und dem EGFR zeigte erstmals, daß die TCDD-Belastung zu einer transienten perinukleären Akkumulation des EGFR führt. Diese korreliert zeitlich mit einer Phosphorylierung des EGFR, die in Gegenwart eines AhR-Antagonisten inhibiert wird. Die Aktivierung des EGFR weist auf einen bisher nicht beschriebenen Signalweg der Genaktivierung durch AhR-Agonisten hin.

Die Untersuchungen der fötalen *AhRR*-Expression in dieser Arbeit deuten erstmals auf eine wichtige Funktion des AhRR in der fötalen Entwicklung hin. Es konnte eine entwicklungspezifische Veränderung der *AhRR*-Expression aufgezeigt werden. Dabei nahm die Expression des *AhRR* über die Zeit der fötalen Entwicklung, von GD 13.5 bis nach der Geburt, ab. Zeitgleich nahm die Expression des *AhR* zu. Ferner zeigte das Ergebnis des Anti-AhRR-Immunoblots, daß der AhRR zum Zeitpunkt GD 13.5 funktionell nukleär vorliegt. Weitere Forschungsarbeiten sind für eine nähere Charakterisierung der physiologischen Funktion des AhRR während der Entwicklung nötig. Dabei ist die Generierung AhRR-defizienter Mäuse die Methode der Wahl. Nur in diesen Studien ist eine physiologische Funktion des AhRR, die sich phänotypisch ausprägen würde, deutbar.

In dieser Arbeit konnte im Vergleich zu den Ergebnissen von Mimura et al. (1999), eine konstitutive Expression des *AhRR* in allen untersuchten Geweben gefunden werden. Durch die Studie mit AhR-defizienten Mäusen konnte die AhR-abhängige Expression des *AhRR* gestützt werden. Bei der Untersuchung der Induktion AhR-abhängiger Gene zeigte sich für die Funktion des AhRR, daß ein bisher angenommenes Prinzip der negativen Rückkopplung *in vivo* nicht untermauert werden kann.

Zusammenfassung

Der AhR und der AhRR gehören beide der bHLH-PAS-Proteinfamilie an und sind an der komplexen Regulation AhR-abhängiger Gene beteiligt. Der AhR kontrolliert u.a. die Expression fremdstoffmetabolisierender Enzyme nach Belastung durch Xenobiotika. Aus transienten Genexpressionensstudien wird von einer negativen Rückkopplung der AhR-abhängigen Genregulation durch den AhRR ausgegangen.

Gegenstand dieser Arbeit war eine nähere Aufklärung zur Expression und Induktion von AhR-regulierten Genen in Geweben der Maus, wobei insbesondere der Einfluß des AhRR auf diese Prozesse untersucht wurde. Hierzu wurden Expressions- und Western-Blot Analysen an adulten Tieren, an fötalen Lebern sowie an fötalen Leberzellen in Kultur durchgeführt.

Die *in vivo*-Beobachtungen in adulten Geweben von Wildtyp und AhR-defizienten Mäusen zeigen erstmals eine AhR-abhängige und gewebespezifische konstitutive *AhRR* mRNA-Expression auf. Die Belastung von Wildtyp-Mäusen mit B[a]P und die simultane Bestimmung der *CYP1A1* und *AhRR* mRNA-Expression unterstützten nicht die Hypothese der repressiven Funktion des AhRR auf die Regulation AhR-abhängiger Gene.

Durch Prüfung der mRNA-Expression in fötalen Lebern der Maus *in vivo* konnte eine gegenläufige Expression des *AhR* und *AhRR* dargestellt werden. Während der fötalen Leberentwicklung nimmt die mRNA-Expression des *AhRR* ab, und die des *AhR* zu. Durch die nachweislich nukleäre Lokalisation des AhRR zu einem frühen Entwicklungszeitpunkt konnte auf einen aktiven AhRR geschlossen werden, welcher möglicherweise eine wichtige Funktion in dieser Entwicklungs-Phase hat.

Zusätzlich konnten neue Erkenntnisse über die Wirkung des AhR-Agonisten TCDD auf die Homöostase der hepatischen Zellregulation gewonnen werden. Hierzu wurde in dem etablierten hepatischen *in vitro*-System der tumorpromovierende Effekt von TCDD simuliert. Dabei führt die TCDD-Belastung zu einer transienten perinukleären Akkumulation des EGFR. Diese korreliert zeitlich mit einer Phosphorylierung des EGFR, die in Gegenwart eines AhR-Antagonisten inhibiert wird. Eine zeitnahe Aktivierung EGFR nachfolgender Signalwege erfolgt nicht und stellt eine autokrine Schleife der EGFR Aktivierung dar.

Abstract

The AhR and the AhRR both belong to the bHLH-PAS protein family, and both are involved in the regulation of AhR-dependent genes. The AhR functions as a ligand dependent transcription factor and mediates the expression of xenobiotic metabolizing enzymes of phase I and II. The AhRR is assumed to control the transcriptional regulation of AhR-dependent genes by feedback inhibition.

The aim of this thesis was to examine the regulation and inducibility of AhR-dependent genes in mice tissues, with a closer examination into the influence of the AhRR on these processes. For this, gene expression studies and western-blot analyses were performed in adult mice, fetale mice liver, and primary fetal liver cells of mice respectively.

The analyzed tissue distribution of *AhRR* in adult AhR-deficient and wild-type mice shows a tissue-specific constitutive *AhRR* mRNA expression. In contrast to wild-type animals, the tissue levels in AhR-deficient mice were very low, and underline the AhR-dependent expression of *AhRR*. In addition to this, the inducibility of the *AhRR* and Cytochrome P450 (CYP) *1A1* in response to benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) has been analyzed. Simultaneous measurements of *CYP1A1* and *AhRR* mRNA expression do not support the view strongly that the AhRR tissue pattern triggers the tissue specific responsiveness of AhR-regulated genes to B[*a*]P treatment.

In contrast to low *AhRR* mRNA expression in adult liver, fetal liver samples exhibit higher levels of *AhRR* mRNA, which decrease significantly with the time of fetal maturation. Reversely, the *AhR* mRNA expression increase with the stage of fetal development. The nuclear localization of the AhRR protein suggests an active AhRR during early stages of development. Those AhRR could have an important influence on fetal liver maturation.

In respect to the influence of the AhR-agonist on hepatic cell-regulation, proposed EGFR and AhR interaction were estimated in primary fetal liver cells. The established cell system shows typical hepatocyte characteristics, and simulates the proliferating effect of TCDD. The molecular analyses show that TCDD treatment leads as well to AhR-dependent transient phosphorylation, as to nuclear internalization of the EGFR. A contemporary activation of EGFR-ERK signaling failed and the late activation seems to be an autocrine loop of EGFR activation.

Literatur

- B. D. Abbott und M. R. Probst. Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: II. Expression of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in the C57BL/6N mouse embryo. *Dev Dyn*, 204(2):144–55, 1995.
- B. D. Abbott, L. S. Birnbaum, und G. H. Perdew. Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo. *Dev Dyn*, 204(2):133–43, 1995.
- B. D. Abbott, M. R. Probst, G. H. Perdew, und A. R. Buckalew. AH receptor, ARNT, glucocorticoid receptor, EGF receptor, EGF, TGF alpha, TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 expression in human embryonic palate, and effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Teratology*, 58:30–43, 1998.
- J. Abel, W. Li, O. Döhr, C. Vogel, und S. Donat. Dose-response relationship of cytochrome P4501b1 mRNA induction by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in livers of C57BL/6J and DBA/2J mice. *Arch Toxicol*, 70:510–3, 1996.
- J. Adachi, Y. Mori, S. Matsui, H. Takigami, J. Fujino, H. Kitagawa, C. A. 3rd Miller, T. Kato, K. Saeki, und T. Matsuda. Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J Biol Chem*, 276(34):31475–8, 2001.
- J. Adachi, Y. Mori, S. Matsui, und T. Matsuda. Comparison of gene expression patterns between 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and a natural arylhydrocarbon receptor ligand, indirubin. *Toxicol Sci*, 80:161–9, 2004.
- S. A. Ahmed, R. M. Jr. Gogal, und J. E. Walsh. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3h]thymidine incorporation assay. *J. Immunol. Methods.*, 170(2):211–24, 1994. ISSN 0022-1759 (Print).

- E. Akahoshi, S. Yoshimura, und M. Ishihara-Sugano. Over-expression of AhR (aryl hydrocarbon receptor) induces neural differentiation of Neuro2a cells: neurotoxicology study. *Environ Health*, 5:24, 2006.
- S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, und D. J. Lipman. Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.*, 215(3):403–410, 1990.
- P. Andersson, J. McGuire, C. Rubio, K. Gradin, M. L. Whitelaw, S. Pettersson, A. Hanberg, und L. Poellinger. A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(15):9990–5, 2002.
- F. M. Ausubel, Hrsg. *Short protocols in molecular biology*, volume 4. Wiley, New York, 1992.
- T. Baba, J. Mimura, K. Gradin, A. Kuroiwa, T. Watanabe, Y. Matsuda, J. Inazawa, K. Sogawa, und Y. Fujii-Kuriyama. Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J Biol Chem*, 276(35):33101–10, 2001.
- Mark A Baker und R John Aitken. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol*, 3(1477-7827 (Electronic)):67, 2005.
- T. Bernshausen, B. Jux, C. Esser, J. Abel, und E. Fritsche. Tissue distribution and function of the Aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) in C57BL/6 and Aryl hydrocarbon receptor deficient mice. *Arch Toxicol*, 80(4):206–11, 2006. ISSN 0340-5761 (Print).
- L. F. Bjeldanes, J. Y. Kim, K. R. Grose, J. C. Bartholomew, und C. A. Bradfield. Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88:9543–7, 1991.
- S. Blanchet, K. Ramgolam, A. Baulig, F. Marano, und A. Baeza-Squiban. Fine Particulate Matter Induces Amphiregulin Secretion by Bronchial Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 30:421–427, 2004.

- A Blankenship und F Matsumura. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced activation of a protein tyrosine kinase, pp60src, in murine hepatic cytosol using a cell-free system. *Mol Pharmacol*, 52:667–75, 1997.
- K. W. Bock und C. Koehle. Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochem Pharmacol*, 72(4):393–404, 2006.
- J. S. Boesch, R. Miskimins, W. K. Miskimins, und R. Lindahl. The same xenobiotic response element is required for constitutive and inducible expression of the mammalian aldehyde dehydrogenase-3 gene. *Arch Biochem Biophys*, 361:223–30, 1999.
- D. W. Bombick, J. Jankun, K. Tullis, und F. Matsumura. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes increases in expression of c-erb-A and levels of protein-tyrosine kinases in selected tissues of responsive mouse strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85:4128–32, 1988.
- D. R. Boverhof, L. D. Burgoon, C. Tashiro, B. Chittim, J. R. Harkema, D. B. Jump, und T. R. Zacharewski. Temporal and dose-dependent hepatic gene expression patterns in mice provide new insights into TCDD-mediated hepatotoxicity. *Toxicol Sci*, 85(2): 1048–1063, 2005.
- M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–54, 1976.
- M. K. Bungler, S. M. Moran, E. Glover, T. L. Thomae, G. P. Lahvis, B. C. Lin, und C. A. Bradfield. Resistance to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity and abnormal liver development in mice carrying a mutation in the nuclear localization sequence of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, 278(20):17767–74, 2003.
- A. D. Burdick, J. W. Davis, K. J. Liu, L. G. Hudson, H. Shi, M. L. Monske, und S. W. Burchiel. Benzo(a)pyrene Quinones Increase Cell Proliferation, Generate Reactive Oxygen Species, and Transactivate the Epidermal Growth Factor Receptor in Breast Epithelial Cells. *Cancer Res*, 63:7825–7833, November 15 2003.

- D. B. Carlson und G. H. Perdew. A Dynamic Role for the Ah Receptor in Cell Signaling? Insights from a Diverse Group of Ah Receptor Interacting Proteins. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 16(6):317–325, 2002.
- G. Carpenter. Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J Cell Biol*, 146(697-702), 1999.
- P. Chomczynski und N. Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1):156–9, 1987.
- D. Choudhary, I. Jansson, J.B. Schenkman, M. Sarfarazi, und I. Stoilov. Comparative expression profiling of 40 mouse cytochrome p450 genes in embryonic and adult tissues. *Arch Biochem Biophys*, 414:91–100, 2003.
- G. Cleffmann. *Stoffwechselphysiologie der Tiere: Stoff- und Energieumsetzung als Regelprozesse*. UTB, Stuttgart, 2 edition, 1987.
- J. W. Davis, A. D. Burdick, F. T. Lauer, und S. W. Burchiel. The aryl hydrocarbon receptor antagonist, 3'-methoxy-4'-nitroflavone, attenuates 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-dependent regulation of growth factor signaling and apoptosis in the MCF-10A cell line. *Toxicol Appl Pharmacol*, 188(1):42–49, 2003.
- J.W. Davis, K. Melendez, V. M. salas, F. T. Lauer, und S. W. Burchiel. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) inhibits growth factor withdrawal-induced apoptosis in the human mammary epithelial cell line, MCF-10A. *Carcinogenesis*, 21(5):881–886, 2000.
- J.W. Davis, F. T. Lauer, A. D. Burdick, L. G. Hudson, und S. W. Burchiel. Prevention of Apoptosis by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the MCF-10A Cell Line: Correlation with Increased Transforming Growth Factor a Production. *Cancer Res*, 61:3314–3320, April 15 2001.
- M. S. Denison und S. R. Nagy. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 43: 309–34, 2003.

- M. S. Denison, J. M. Fisher, und J. P. Jr Whitlock. The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. *J Biol Chem*, 263(33):17221–4, 1988.
- E. Derman, K. Krauter, L. Walling, C. Weinberger, M. Ray, und J. E. Jr Darnell. Transcriptional control in the production of liver-specific mRNAs. *Cell*, 23:731–9, 1981.
- U. Deschel. Morphologie der Leber. In *Grundlagen der Organtoxikologie und -pathologie I*, Weiterbildung zum Fachtoxikologen DGPT, Erfurt, 31.01.-05.02. 2005. DGPT.
- O. Döhr, C. Vogel, und J. Abel. Modulation of growth factor expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Exp Clin Immunogenet*, 11(0254-9670 (Print)):142–148, 1994.
- O. Döhr, C. Vogel, und J. Abel. Different response of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-sensitive genes in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB 231 cells. *Arch Biochem Biophys*, 321(0003-9861 (Print)):405–12, 1995.
- C. J. Elferink. Aryl hydrocarbon receptor-mediated cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res*, 5:261–7, 2003.
- G. Elizondo, P. Fernandez-Salguero, M. S. Sheikh, G. Y. Kim, A. J. Fornace, K. S. Lee, und F. J. Gonzalez. Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast. *Mol Pharmacol*, 57:1056–63, 2000.
- M Ema, N Ohe, M Suzuki, J Mimura, K Sogawa, S Ikawa, und Y Fujii-Kuriyama. Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors. *J Biol Chem*, 269(44):27337–43, 1994. ISSN 0021-9258 (Print).
- E. Enan und F. Matsumura. Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem Pharmacol*, 52:1599–612, 1996.

- E. Enan, D. Y. Dunlap, and F. Matsumura. Use of c-Src and c-Fos Knockout Mice for the Studies on the Role of c-Src Kinase signaling in the Expression of Toxicity of TCDD. *J Biochem Toxicol*, 12(5):263–274, 1998a.
- E. Enan, F. El-Sabeawy, M. Scott, J. Overstreet, and B. Lasely. Alterations in the growth factor signal transduction pathways and modulation of the cell cycle in endocervical cells from macaques exposed to TCDD. *Toxicol Appl Pharmacol*, 151(283-293), 1998b.
- B. R. Evans, S. I. Karchner, D. G. Franks, and M. E. E. Hahn. Duplicate aryl hydrocarbon receptor repressor genes (ahrr1 and ahrr2) in the zebrafish danio rerio: structure, function, evolution, and ahr-dependent regulation in vivo. *Arch Biochem Biophys*, 441:151–67, 2005.
- P. M. Fernandez-Salguero, J. M. Ward, J. P. Sundberg, and F. J. Gonzalez. Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. *Vet Pathol*, 34:605–14, 1997.
- L. Fialkow, C. K. Chan, D. Rotin, S. Grinstein, and G. P. Downey. Activation of the Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Pathway in Neutrophils. *J Biol Chem*, 269(49):31234–31242, 1994.
- R. Filler und L. J. Kimberly. Developmental onset of mixed-function oxidase activity in preimplantation mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78(11):6991–6995, November 1981.
- E. Fritsche, C. Schäfer, C. Calles, T. Bernsmann, T. Bernshausen, M. Wurm, U. Hübenthal, J.E. Cline, H. Hajimiragha, P. Schroeder, A. Rannug, L.-O. Klotz, P. Fürst, H. Hanenberg, J. Abel, and Krutmann J. Lightning up the UV response: the Arylhydrocarbon Receptor is a cytoplasmatic photosensor. *Proc Natl Acad Sci USA*, in press, 2007.
- Y. Fujii-Kuriyama und J. Mimura. Transcriptional roles of AhR in expression of biological effects induced by endocrine disruptors. *Pure Appl. Chem.*, 75(11-12):1819–1826, 2003.
- Y. Fujii-Kuriyama und J. Mimura. Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 338:311–7, 2005.

- H. Fujita, R. Kosaki, H. Yoshihashi, T. Ogata, M. Tomita, T. Hasegawa, T. Takahashi, N. Matsuo, und K. Kosaki. Characterization of the aryl hydrocarbon receptor repressor gene and association of its Pro185Ala polymorphism with micropenis. *Teratology*, 65:10–8, 2002.
- K. W. Gaido, S. C. Maness, L. S. Leonard, und W. F. Greenlee. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-dependent Regulation of Transforming Growth Factors- α and - β Expression in a Human Keratinocyte Cell Line Involves Both Transcriptional and Post-transcriptional Control. *J Biol Chem*, 267(34):24591–24595, 1992.
- N. L. Ge und C. J. Elferink. A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin signaling to the cell cycle. *J Biol Chem*, 273(35):22708–13, 1998.
- J. E. Gielen, F. M. Goujon, und D. W. Nebert. Genetic Regulation of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Induction. *J Biol Chem*, 247(4):1125–1137, 1972.
- G Goertz, W Barnstorf, G Winnekendonk, K Bolsen, C Fritsch, K Kalka, und D Tsambalos. Influence of UVA and UVB irradiation on hepatic and cutaneous P450 isoenzymes. *Arch Dermatol Res*, 289:46–51, 1996.
- C. Gouedard, R. Barouki, und Y. Morel. Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Mol Cell Biol*, 24(12):5209–5222, 2004.
- Y. Z. Gu, J. B. Hogenesch, und C. A. Bradfield. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40:519–61, 2000.
- S. Gupta, J. Banerjee, und A. Agarwal. The Impact of Reactive Oxygen Species on Early Human Embryos: A Systematic Review of the Literature. *Embryo Talk*, 1.2: 87–98, 2006.
- T. Haarmann-Stemmann und J. Abel. The arylhydrocarbon receptor repressor (AhRR):structure, expression, and function. *Biol Chem*, 387:1195–1199, 2006.

- T. Haarmann-Stemmann, H. Bothe, A. Kohli, U. Sydlik, J. Abel, und E. Fritsche. Analysis of the transcriptional regulation and molecular function of the Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor in human cell lines. *Drug Metab Dispos*, [Epub ahead of print], 2007.
- M. Haas, H. Wang, J. Tian, und Z. Xie. Src-mediated Inter-receptor Cross-talk between the Na/K-ATPase and the Epidermal Growth Factor Receptor Relays the Signal from Ouabain to Mitogen-activated Protein Kinases. *J Biol Chem*, 277(21):18694–18702, May 2002.
- O. Hankinson. Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys*, 433:379–86, 2005.
- Patricia A Harper, David S Riddick, und Allan B Okey. Regulating the regulator: factors that control levels and activity of the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Pharmacol*, 72(3):267–79, 2006. ISSN 0006-2952 (Print).
- S. Härtter. In vitro Methoden zur Untersuchung des Phase-I Metabolismus. *Pharmazie in unserer Zeit*, 29(6):365–371, 2000.
- S. Heath-Pagliuso, W. J. Rogers, K. Tullis, S. D. Seidel, P. H. Cenijn, A. Brouwer, und M. S. Denison. Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry*, 37:11508–15, 1998.
- B. Hogan, R. Beddington, F. Costantini, und E. Lacy. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2nd edition, 1994.
- E. Houssaint. Differentiation of the mouse hepatic primordium. i. an analysis of tissue interactions in hepatocyte differentiation. *Cell Differ*, 9(5):269–279, 1980.
- P. Huang, S. Ceccatelli, P. Hoeberg, T.-J. Sten Shi, H. Hakansson, und A Rannug. Constitutive and TCDD-induced expression of Ah receptor-responsive genes in pituitary and brain of cellular retinol-binding protein (CRBP-1) knockout mice. *Neurotoxicology*, 23:783–793, 2002.

- T Ikuta, Y Kobayashi, und K Kawajiri. Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, 279(18):19209–16, 2004a. ISSN 0021-9258 (Print).
- T Ikuta, Y Kobayashi, und K Kawajiri. Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 317(2):545–50, 2004b. ISSN 0006-291X (Print).
- Y. Inoue, T. Tomiya, M. Yanase, M. Arai, H. Ikeda, K Tejima, I. Ogata, S. Kimura, M. Omata, und K. Fujiwara. p53 May Positively Regulate Hepatocyte Proliferation in Rats. *Hepatology*, 36(2):336–344, 2002.
- H. Jyonouchi, S. Sun, K. Iijima, M. Wang, und S.S. Hecht. Effects of anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetra-hydrobenzo[a]pyrene on human small airway epithelial cells and the protective effects of myo-inositol. *Carcinogenesis*, 20:139–145, 1999.
- A. Kamiya, T. Kinoshita, Y. Ito, T. Matsui, Y. Morikawa, E. Senba, K. Nakashima, T. Taga, K. Yoshida, T. Kishimoto, und A. Miyajima. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin m through the gp130 signal transducer. *EMBO J*, 18: 2127–36, 1999.
- A. Kamiya, N. Kojima, T. Kinoshita, Y. Sakai, und A. Miyajima. Maturation of fetal hepatocytes in vitro by extracellular matrices and oncostatin m: induction of tryptophan oxygenase. *Hepatology*, 35:1351–9, 2002.
- S. I. Karchner, D. G. Franks, W. H. Powell, und M. E. Hahn. Regulatory interactions among three members of the vertebrate aryl hydrocarbon receptor family: Ahr repressor, ahr1, and ahr2. *J Biol Chem*, 277:6949–59, 2002.
- A Kazlauskas, L Poellinger, und I Pongratz. Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem*, 274(19):13519–24, 1999. ISSN 0021-9258 (Print).
- A Kazlauskas, L Poellinger, und I Pongratz. The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. *J Biol Chem*, 275(52):41317–24, 2000. ISSN 0021-9258 (Print).

- H. P. Ko, S. T. Okino, Q. Ma, und J. P. Jr. Whitlock. Dioxin-induced CYP1A1 transcription in vivo: the aromatic hydrocarbon receptor mediates transactivation, enhancer-promoter communication, and changes in chromatin structure. *Mol Cell Biol*, 16(1): 430–6, 1996.
- A. Kobayashi, K. Sogawa, und Y. Fujii-Kuriyama. Cooperative interaction between AhR, Arnt and Sp1 for the drug-inducible expression of CYP1A1 gene. *J Biol Chem*, 271(21):12310–6, 1996.
- C. Köhle, H. Gschaidmeier, D. Lauth, S. Topell, H. Zitzer, und K. W. Bock. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (tcdd)-mediated membrane translocation of c-src protein kinase in liver wb-f344 cells. *Arch Toxicol*, 73:152–8, 1999.
- M. Korkalainen, J. Tuomisto, und R. Pohjanvirta. Primary structure and inducibility by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (tcdd) of aryl hydrocarbon receptor repressor in a tcdd-sensitive and a tcdd-resistant rat strain. *Biochem Biophys Res Commun*, 315:123–31, 2004.
- K. R. Kozak, B. D. Abbott, und O. Hankinson. ARNT-deficient mice and placental differentiation. *Dev Biol*, 191(2):297–305, 1997. ISSN 0012-1606 (Print).
- U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–5, 1970. ISSN 0028-0836 (Print).
- G. P. Lahvis, S. L. Lindell, R. S. Thomas, R. S. McCuskey, C. Murphy, E. Glover, M. Bentz, J. Southard, und C. A. Bradfield. Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(19):10442–10447, 2000.
- N.M. LeDouarin. An experimental analysis of liver development. *Med Biol*, 53:427–455, 1975.
- E.-R. Lee, Y.-J. Kang, J.-H. Kim, H. T. Lee, und S.-G. Cho. Modulation of Apoptosis in HaCaT Keratinocytes via Differential Regulation of ERK Signaling Pathway by Flavonoids. *J Biol Chem*, 280(36):31498–31507, september 9 2005.

- S. Y. Lin, K. Makino, W. Xia, A. Matin, Y. Wen, K. Y. Kwong, L. Bourguignon, and M. C. Hung. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol*, 3:802–8, 2001.
- Y.-F. Lu, M. Santostefano, B. D. M. Cunningham, M. D. Threadgill, and S. Safe. Identification of 3'-Methoxy-4'-nitroflavone as a Pure Aryl hydrocarbon (Ah) Receptor Antagonist and Evidence for More Than One Form of the Nuclear Ah Receptor in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Arch Biochem Biophys*, 316(1):470–477, 1995.
- A. K. Lund, S. L. Peterson, G. S. Timmins, and M. K. Walker. Endothelin-1-Mediated Increase in Reactive Oxygen Species and NADPH Oxidase Activity in Hearts of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Null Mice. *Toxicol Sci*, 88(1):265–273, 2005.
- Q Ma und K T Baldwin. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway. Role of the transcription activaton and DNA binding of AhR. *J Biol Chem*, 275(12):8432–8, 2000. ISSN 0021-9258 (Print).
- Q. Ma und J.-P. Whitlock Jr. The aromatic hydrocarbon receptor modulates the hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin. *Mol Cell Biol*, 16: 2144–2150, 1996.
- J. M. Maglich, C. M. Stoltz, B. Goodwin, D. Hawkins-Brown, J. T. Moore, and A. K. Steven. Nuclear Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor Regulate Overlapping but Distinct Sets of Genes Involved in Xenobiotic Detoxification. *Mol Pharmacol*, 62(3):638–646, 2002.
- T. Matikainen, G.I. Perez, A. Jurisicova, J.K. Pru, J.J. Schlezinger, H.Y. Ryu, J. Laine, T. Sakai, S.J. Korsmeyer, R.F. Casper, D.H. Sherr, and J.L. Tilly. Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet*, 28:355–366, 2001.
- P. R. Mertens, V. Espenkott, B. Venjakob, B. Heintz, S. Handt, und H.-G. Sieberth. Pressure Oscillation Regulates Human Mesangial Cell Growth and Collagen Synthesis. *Hypertension*, 32:945–952, 1998.

- G. K. Michalopoulos. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB J.*, 4:176–187, 1990.
- J. Mimura und Y. Fujii-Kuriyama. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta*, 1619:263–8, 2003.
- J. Mimura, K. Yamashita, K. Nakamura, M. Morita, T. N. Takagi, K. Nakao, M. Ema, K. Sogawa, M. Yasuda, M. Katsuki, und Y. Fujii-Kuriyama. Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells*, 2:645–54, 1997.
- J. Mimura, M. Ema, K. Sogawa, und Y. Fujii-Kuriyama. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev*, 13:20–5, 1999.
- L. Moro, L. Dolce, S. Cabodi, E. Bergatto, E. B. Erba, M. Smeriglio, E. Turco, S. F. Retta, M. G. Giuffrida, M. Venturino, J. Godovac-Zimmermann, A. Conti, E. Schaefer, L. Beguinot, C. Tacchetti, P. Gaggini, L. Silengo, G. Tarone, und P. Defilippi. Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *J Biol Chem*, 277: 9405–14, 2002.
- K. A. Murphy, C. M. Villano, R. Dorn, und L. A. White. Interaction between the Aryl Hydrocarbon Receptor and Retinoic Acid Pathways Increases Matrix Metalloproteinase-1 Expression in Keratinocytes. *J Biol Chem*, 279(24):25284–25293, 2004.
- G. I. Murray, W. T. Melvin, W. F. Greenlee, und M. D. Burke. Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41:297–316, 2001.
- D. W. Nebert, A. L. Roe, M. Z. Dieter, W. A. Solis, Y. Yang, und T. P. Dalton. Role of the Aromatic Hydrocarbon Receptor and [Ah] Gene Battery in the Oxidative Stress Response, Cell Cycle Control, and Apoptosis. *Biochem Pharmacol*, 59:65–85, 2000.
- T. A. Nguyen, D. Hoivik, J. E. Lee, und S. Safe. Interactions of nuclear receptor coactivator/corepressor proteins with the aryl hydrocarbon receptor complex. *Arch Biochem Biophys*, 367:250–7, 1999.

- H. Nishihashi, Y. Kanno, K. Tomuro, T. Nakahama, and Y. Inouye. Primary structure and organ-specific expression of the rat aryl hydrocarbon receptor repressor gene. *Biol Pharm Bull*, 29:640–7, 2006.
- Mattias Öberg, Linda Bergander, Helen Hakansson, Ulf Rannug, and Agneta Rannug. Identification of the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, in cell culture medium, as a factor that controls the background aryl hydrocarbon receptor activity. *Toxicol Sci*, 85(1096-6080 (Print)):935–43, 2005.
- G. H. Perdew. Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J Biol Chem*, 263(27):13802–5, 1988.
- J. M. Peters und L. M. Wiley. Evidence that murine preimplantation embryos express aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Appl Pharmacol*, 134(2):214–21, 1995.
- J. R. Petrusis, A. Kusnadi, P. Ramadoss, B. Hollingshead, and G. H. Perdew. The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity. *J Biol Chem*, 278(4):2677–85, 2003.
- A. M. A. Pfeifer, K. E. Cole, D. T. Smoot, A. Weston, J. D. Groopman, P. G. Shields, J.-M. Vignaud, M. Juillerat, M. M. Lipsky, B. F. Trump, J. F. Lechner, und C. C. Harris. Simian virus 40 large tumor antigen-immortalized normal human liver epithelial cells express hepatocyte characteristics and metabolize chemical carcinogens. *Proc. Natl. Sci. USA*, 90:5123–5127, 1993.
- H.C. Pitot, T. L. Goldsworthy, H.A. Campbell, und A. Poland. Quantitative evaluation of the promotion by 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosamine. *Cancer Res*, 40:3616–3620, 1980.
- A. Poland und C. Knutson. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: Examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 22:517–554, 1982.
- A. Poland, E. Glover, und A. S. Kende. Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is

- receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem*, 251(16):4936–46, 1976.
- H. Qin und J. A. Powell-Coffman. The *Caenorhabditis elegans* aryl hydrocarbon receptor, AHR-1, regulates neuronal development. *Dev Biol*, 270:64–75, 2004.
- A. Rannug, U. Rannug, H. S. Rosenkranz, L. Winqvist, R. Westerholm, E. Agurell, und A. K. Grafstrom. Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J Biol Chem*, 262:15422–7, 1987.
- A.M. Rizzo, L. Adorni, G. Montorfano, F. Rossi, und B. Berra. Antioxidant metabolism of *xenopus laevis* embryos during the first days of development. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 146(1):94–100, 2007. ISSN 1096-4959 (Print).
- R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, und H. A. Erlich. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487–91, 1988.
- J. Sambrook, E.F. Fritsch, und T. Maniatis. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2nd edition, 1989.
- T. Sato, K. and Nagao, T. Iwasaki, Y. Nishihira, und Y. Fukami. Src-dependent phosphorylation of the EGF receptor Tyr-845 mediates Stat-p21waf1 pathway in A431 cells. *Genes Cells*, 8:995–1003, 2003.
- J. Schlessinger und A. Ullrich. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron*, 9:383–391, 1992.
- J. V. Schmidt, G. H. Su, J. K. Reddy, M. C. Simon, und C. A. Bradfield. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:6731–6, 1996.
- D. Schrenk, A. Karger, H. P. Lipp, und K. W. Bock. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and ethinylestradiol as co-mitogens in cultured rat hepatocytes. *Carcinogenesis*, 13: 453–6, 1992.

- T. Schulz. Perinatale Entwicklung von Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen. In *Reproduktionstoxikologie*, Berlin, 27.02.-03.03. 2006. DGPT.
- T. Schulz und D. Neubert. Peculiarities of Biotransformation in the Pre- and Postnatal Period. In Klaus Ruckpaul und Horst Rein, Hrsg., *Regulation and control of complex biological progresses by biotransformation*, volume 9. Akademischer Verlag GmbH, Berlin, 1994.
- L. R. Schwarz. Mechanismen der Leberschädigung. In *Grundlagen der Organtoxikologie und -pathologie I*, Erfurt, 31.01.-05.02. 2005. DGPT.
- M. Schwarz, A. Buchmann, S. Stinchcombe, A. Kalkuhl, und K. Bock. Ah receptor ligands and tumor promotion: survival of neoplastic cells. *Toxicol Lett*, 112-113:69–77, 2000.
- C. H. Sewall, G. C. Clark, und G. W. Lucier. TCDD reduces rat hepatic epidermal growth factor receptor: comparison of binding, immunodetection, and autophosphorylation. *Toxicol Appl Pharmacol*, 132:263–72, 1995.
- W. Seyffert, H.G. Gassen, O. Hess, H. Jäckle, und K.-F. Fischbach, Hrsg. *Lehrbuch der Genetik*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1998.
- T. Shimada, K. Inoue, T. Suzuki, Y. amd Kawai, E. Azuma, T. Nakajima, M. Shindo, K. Kurose, A. Sugie, Y. Yamagishi, Y. Fujii-Kuriyama, und M. Hashimoto. Arylhydrocarbon receptor- dependent induction of liver and lung cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in genetically engineered C57BL/6J mice. *Carcinogenesis*, 23(7):1199–1207, 2002.
- M. Sonnier und T. Cresteil. Delayed ontogenesis of CYP1A2 in the human liver. *Eur J Biochem*, 251:893–8, 1998.
- F. M. Spagnoli, L. Amicone, M Tripodi, und M. C. Weiss. Identification of a Bipotential Precursor Cell in Hepatic Cell Lines Derived from Transgenic Mice Expressing Cyto-Met in the Liver. *J Cell Biol*, 143(4):1101–1112, November 1998.
- S. R. Srinivas, E. Gopal, L. Zhuang, S. Itagaki, P. M. Martin, Y.-J. Fei, V. Ganapathy, und P. D. Prasad. Cloning and functional identification of slc5a12 as a sodium-coupled

- low-affinity transporter for monocarboxylates (SMCT2). *Biochem J*, 392(655-664), 2005.
- D. R. Stover, M. Becker, J. Liebetanz, und N. B. Lydon. Src phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at novel sites mediates receptor interaction with Src and P85 alpha. *J Biol Chem*, 270:15591–7, 1995.
- N. C. Sun, C. R. Y. Sun, R. W. Tennant, und A. W. Hsie. Selective growth of some rodent epithelial cells in a medium containing citrulline. *Proc. Natl. Sci. USA*, 76(4): 1819–1823, April 1979.
- A. Suzuki, Y. Zheng, R. Kondo, M. Kusakabe, Y. Takada, K. Fukao, H. Nakauchi, und H. Taniguchi. Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology*, 32(6):1230–1239, 2000.
- A. Suzuki, A. Iwama, H. Miyashita, H. Nakauchi, und H. Taniguchi. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development*, 130:2513–2524, 2003.
- Z. Tan, M. Huang, A. Puga, und Y. Xia. A critical role for MAP kinases in the control of Ah receptor complex activity. *Toxicol Sci*, 82:80–7, 2004.
- Y. M. Tang, Y. Y. Wo, J. Stewart, A. L. Hawkins, C. A. Griffin, T. R. Sutter, und W. F. Greenlee. Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. *J Biol Chem*, 271(45):28324–30, 1996. ISSN 0021-9258 (Print).
- S. L. Tannheimer, S. P. Ethier, K. K. Caldwell, und S. W. Burchiel. Benzo[a]pyrene- and TCDD-induced alterations in tyrosine phosphorylation and insulin-like growth factor signaling pathways in the MCF-10A human mammary epithelial cell line. *Carcinogenesis*, 19(7):1291–1297, 1998.
- B. L. Taylor und I. B. Zhulin. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63(2):479–506, 1999.
- D. A. Tice, J. S. Biscardi, A. L. Nickles, und S. J. Parsons. Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:1415–20, 1999.

- Y. Tsuchiya, M. Nakajima, S. Itoh, M. Iwanari, und T. Yokoi. Expression of aryl hydrocarbon receptor repressor in normal human tissues and inducibility by polycyclic aromatic hydrocarbons in human tumor-derived cell lines. *Toxicol Sci*, 72(1096-6080 (Print)):253–9, 2003.
- G.E. Tusnady, I. Simon, A. Varadi, und T. Aranyi. Bisearch: primer-design and search tool for pcr on bisulfite-treated genomes. *Nucleic Acids Res.*, 33(1):1–6, 2005.
- Rika Ueda, Hiromi Iketaki, Kiyoshi Nagata, Shioko Kimura, Frank J Gonzalez, Kazutomi Kusano, Tsutomu Yoshimura, und Yasushi Yamazoe. A common regulatory region functions bidirectionally in transcriptional activation of the human CYP1A1 and CYP1A2 genes. *Mol Pharmacol*, 69(6):1924–30, 2006. ISSN 0026-895X (Print).
- C. Vogel und J. Abel. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on growth factor expression in the human breast cancer cell line mcf-7. *Arch Toxicol*, 69:259–65, 1995.
- C. Vogel, S. Donat, O. Döhr, J. Kremer, C. Esser, M. Roller, und J. Abel. Effect of subchronic 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on immune system and target gene responses in mice: calculation of benchmark doses for CYP1A1 and CYP1A2 related enzyme activities. *Arch Toxicol*, 71:372–382, 1997.
- C. Vogel, A.M. J. F. Boerboom, C. Baechle, C. El-Bahay, R. Kahl, G. H. Degen, und J Abel. Regulation of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 induction by dioxin in rat hepatocytes: possible c-Src-mediated pathway. *Carcinogenesis*, 21(12):2267–2274, 2000.
- J. A. Walisser, M. K. Bungler, E. Glover, und C. A. Bradfield. Gestational exposure of Ahr and Arnt hypomorphs to dioxin rescues vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(47):16677–16682, November 2004.
- S. Wang und O. Hankinson. Functional Involvement of the Brahma/SWI2-related Gene 1 Protein in Cytochrome P4501A1 Transcription Mediated by the Aryl Hydrocarbon Receptor Complex. *J Biol Chem*, 277(14):11821–11827, 2002.
- J.-P. Whitlock Jr. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39: 103–25, 1999.

- S. Wilkening, F. Stahl, und A. Bader. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cellline HEPG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos*, 31(8):1035–1042, 2003.
- M.E. Wyde, V.A. Wong, A.H. Kim, G.W. Lucier, und N.J. Walker. Induction of hepatic 8-oxo-deoxyguanosine adducts by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Sprague-Dawley rats is female-specific and estrogen-dependent. *Chem Res Toxicol*, 14(7):849–55, 2001. ISSN 0893-228X (Print).
- J. Yamamoto, K. Ihara, H. Nakayama, S. Hikino, K. Satoh, N. Kubo, T. Iida, Y. Fujii, und T. Hara. Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: organ-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells. *Life Sci*, 74(0024-3205 (Print)):1039–49, 2004.
- X. Yang, D. Liu, T. J. Murray, G.C. Mitchell, E.V. Hesterman, S. I. Karchner, R.R. Merson, M.E. Hahn, und D.H. Sherr. The aryl hydrocarbon receptor constitutively represses c-myc transcription in human mammary tumor cells. *Oncogene*, 24(53):7869–81, 2005. ISSN 0950-9232 (Print).
- D. Zhao, Y. Zhan, H. W. Koon, H. Zeng, S. Keates, M. P. Moyer, und C Pothoulakis. Metalloproteinase-dependent TGFalpha release mediates neurotensin-stimulated MAP kinase activation in human colonic epithelial cells. *J Biol Chem*, Published online on July 6, 2004 as Manuscript M401453200, 2004.
- R. Zhao und S. A. Duncan. Embryonic development of the liver. *Hepatology*, 41:956–67, 2005.
- J. Zhou und T. A. Gasiewicz. 3'-Methoxy-4'-nitroflavone, a reported aryl hydrocarbon receptor antagonist, enhances Cyp1a1 transcription by a dioxin responsive element-dependent mechanism. *Arch Biochem Biophys*, 416:68–80, 2003.
- J. Zhou, J. Zhang, und W. Xie. Xenobiotic nuclear receptor-mediated regulation of UDP-glucuronosyl-transferases. *Curr Drug Metab*, 6:289–98, 2005.
- C. Zwicky, S. Gerber, D. Gasparini, F. Forestier, P. Hohlfeld, J.-D. Tissot, und P. Schneider. Preparation and analysis of fetal liver extracts. *Bone Marrow Transplantation*, 26:667–671, 2000.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herr Prof. Dr. Josef Abel. Ich möchte mich für die Überlassung dieses äußerst interessanten Themas, das in mich gesetzte Vertrauen, für die breite Unterstützung und für die gute Ausbildung auf dem Gebiet der Toxikologie vielmals bedanken.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Wunderlich, dass er als Koreferent zur Verfügung stand und die fakultätsübergreifende Betreuung ermöglichte.

Den Mitarbeiterinnen aus dem Tierhaus, der Arbeitsgruppe Esser und denen der Arbeitsgruppe Toxikologie möchte ich vielmals für Ihre technische Unterstützung danken. Danken möchte ich auch den zahlreichen Kolleginnen und Kollegen im Institut für umweltmedizinische Forschung für Ihre kollegiale Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Thomas Haarmann-Stemmann und Ulrich Sydlik.

Gerne möchte ich mich bei Herrn Dr. Schwab für die kritische Durchsicht des Manuskripts bedanken.

Danke möchten ich meinen guten Freunden in Hamburg, Köln, Essen, Düsseldorf und dem Rest der Welt.

Meiner Familie möchte ich herzlichst für Ihr Vertrauen und Ihre umfassende Unterstützung danken und daß sie mir diesen Weg geebnet haben. Ich habe Ihnen viel zu verdanken.

Danken möchte ich meiner Frau Katrin für Ihre wundervolle Art, die mir sehr viel Geduld, Verständnis und Liebe entgegenbringt. Danken möchte ich meinen Kindern Liza-Marie und Bo Moritz für ihre Geduld, auch wenn der Papa mal keine Zeit hatte und das sie mir durch Ihre aufgeweckte Art sehr viel Kraft geben.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Waldbrunn, 21.11.2007

Thorsten Bernshausen

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit zugrundeliegenden Ergebnisse wurde im Vorfeld mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Betreuer der Arbeit, veröffentlicht:

Peer reviewed:

- Bernshausen T., Jux B., Esser C., Abel J., und Fritsche E.
Tissue distribution and function of the Aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) in C57BL/6 and Aryl hydrocarbon receptor deficient mice.
Arch Toxicol. 2006 Apr;80(4):206-11.
- Fritsche E., Schäfer C., Calles C., Bernsmann T., Bernshausen T., Wurm M., Hübenthal U., Cline J.E., Hajimiragha H., Schroeder P., Klotz L.O., Rannug A., Fürst P., Hanenberg H., Abel J., Krutmann J.
Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 May 22;104(21):8851-6.

Posterpräsentationen:

- 46. FRÜHJAHRSTAGUNG DER DGPT (Mainz, Deutschland, 15-17 März 2005):
Tissue distribution of Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor (AhRR) expression in C57BL/6 and AhR deficient (AhR^{-/-}) mice
- SIXTH DUESSELDORF SYMPOSIUM ON IMMUNOTOXICOLOGY
Biochemistry and Function of the Arylhydrocarbon Receptor and other PAS-bHLH Proteins (Düsseldorf, Deutschland, 28-30 September 2005):
Tissue distribution and function of Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor (AhRR) expression in C57BL/6 and Aryl Hydrocarbon Receptor deficient mice
- ENTOX (Dortmund, Deutschland, 10-11 Mai 2007):
Expression and Function of the Arylhydrocarbon Receptor Repressor (AhRR)