

# **Natürliche Lebensmittelinhaltsstoffe als Liganden des Ah Rezeptors**

**Identifizierung und Charakterisierung von  $\beta$ -Carbolinen mit  
AhR Ligandenpotential mittels funktioneller Bioassays**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Diana Kemmer**

aus Würzburg

**Würzburg 2005**

Eingereicht am: .....

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: .....

2. Gutachter: .....

der Dissertation

1. Prüfer: .....

2. Prüfer: .....

3. Prüfer: .....

des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

***Meiner Familie***



## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2001 bis Dezember 2003 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Markus Herderich danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, das entgegengebrachte Vertrauen, die gewährten Freiräume und die unkomplizierte, kompetente wissenschaftliche Betreuung und Förderung - trotz der Entfernung Würzburg – Adelaide.

Herrn Prof. Dr. Peter Schreier gilt mein Dank für die Möglichkeit, an seinem Lehrstuhl promovieren zu können, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und für die mir stets gewährte Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Michael S. Denison vom Lehrstuhl für Environmental Toxicology der University of California in Davis gilt mein besonderer Dank für die Überlassung der Zelllinien H1L6.1 und H1G1.1, für die sehr gute Kooperation und die hervorragende Betreuung und Unterstützung während meines Forschungsaufenthalts in Davis.

Herrn Prof. Manfred Gessler und Herrn Prof. Dieter Palm vom Lehrstuhl für Physiologische Chemie der Universität Würzburg möchte ich für die Möglichkeit, ihr Zellkulturlabor nutzen zu können und für die freundliche Zusammenarbeit danken.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen ehemaligen und jetzigen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises, insbesondere bei den Mitgliedern des „Frauenkellers“ Anke Meisner, Dominique Kavvadias und Thomas Wickert, für das freundschaftliche Verhältnis, die sehr gute Zusammenarbeit und die vielen wertvollen Diskussionen.

Den Kolleginnen und Kollegen in Davis und in der „Bio“ möchte ich für die freundliche Aufnahme, die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft bei allen Assay- und Zellkulturfragen danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und Norbert, die mich jederzeit ermutigt und vielfältig unterstützt haben.

Schließlich danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Förderung dieses Projektes.



## Publikationen

Kemmer, D., Diem, S., Gutsche, B., Herderich, M. (2001) Glycosylation products of tryptophan in nutritional sources: Identification of novel tryptophan metabolites by HPLC-MS/MS studies. Abstract of Papers, 222<sup>nd</sup> ACS National Meeting, Chicago, IL, USA

Adam, W., Marquardt, S., Kemmer, D., Saha-Moeller, C. R., Schreier, P. (2002) 2'-Deoxy-guanosine (DG) oxidation and strand-break formation in DNA by the radicals released in the photolysis of N-tert-butoxy-2-pyridone. Are tert-butoxyl or methyl radicals responsible for the photooxidative damage in aqueous media? *Organic Letters*, **4**, 225-228

Adam, W., Marquardt, S., Kemmer, D., Saha-Moeller, C. R., Schreier, P. (2002) Photobiological model studies on perester and pyridone tert-butoxyl radical sources (photo-Fenton-type reagents): 2'-deoxyguanosine modification by methyl radicals generated through competitive  $\beta$ -cleavage in aqueous media. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **1**, 609-612

## Vorträge

„Glycosylation products of tryptophan in nutritional sources: Identification of novel tryptophan metabolites by HPLC-MS/MS studies.“ National Meeting of the American Chemical Society, Chicago, IL, USA, 26. bis 30. August 2001



# Inhalt

## ABKÜRZUNGEN

## ZUSAMMENFASSUNG

## SUMMARY

<b>A</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>B</b>	<b>KENNTNISSTAND .....</b>	<b>3</b>
<b>1</b>	<b>Der Aryl hydrocarbon Rezeptor .....</b>	<b>3</b>
1.1	Die Struktur des Aryl hydrocarbon Rezeptors.....	3
1.2	Mechanismus der AhR vermittelten Genexpression.....	6
1.3	Modulation der zellulären AhR Gehalte .....	9
1.3.1	Der ligand-aktivierte AhR Abbau.....	9
1.3.2	Das AhR Repressor Protein (AhRR) .....	10
<b>2</b>	<b>Liganden des Ah Rezeptors .....</b>	<b>11</b>
2.1	Klassische Liganden – PAHs und HAHs.....	11
2.2	Nicht-klassische synthetische AhR Liganden .....	14
2.3	Natürliche Liganden des Ah Rezeptors.....	16
2.3.1	Natürliche aus der Nahrung stammende AhR Liganden .....	16
2.3.1.1	Indole und indolhaltige Verbindungen.....	16
2.3.1.2	Carotinoide .....	19
2.3.1.3	Heterozyklische Amine .....	20
2.3.1.4	Flavonoide.....	21
2.3.1.5	Pflanzliche Extrakte .....	22
2.3.2	Endogene Liganden .....	22
2.3.2.1	Indole.....	23
2.3.2.2	Tetrapyrrole .....	24
2.3.2.3	Arachidonsäure-Metabolite .....	25
2.3.2.4	Sonstige endogene Liganden.....	26

<b>3</b>	<b>Toxische und biochemische Effekte von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-<i>p</i>-dioxin (TCDD) und verwandten Verbindungen.....</b>	<b>29</b>
3.1	Übersicht der durch TCDD ausgelösten Effekte.....	29
3.2	Übersicht über die durch AhR Liganden und Induktoren regulierten Genprodukte.....	34
3.3	Mögliche Mechanismen der TCDD Toxizität.....	36
3.3.1	Veränderungen der Genexpression.....	37
3.3.2	Einfluss auf Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellzyklus und Apoptose .....	38
3.3.3	Wechselwirkungen mit anderen Signalwegen.....	39
<b>4</b>	<b>Bioassays für AhR Liganden .....</b>	<b>41</b>
4.1	Einführung.....	41
4.2	Spezielle Bioassays für AhR Liganden.....	42
4.3	Reportergenassays .....	44
4.3.1	Definition der Reportergene.....	44
4.3.2	Übersicht über die gängigsten Reportergensysteme.....	44
4.3.3	GFP- und Luciferase-Reportergensysteme.....	47
4.3.3.1	Das grün fluoreszierende Protein (GFP) .....	47
4.3.3.2	Luciferase .....	51
4.4	Reportergenplasmide.....	53
4.4.1	Reporterplasmide pGudLuc6.1 und pGreen1.1 .....	54
<b>5</b>	<b><math>\beta</math>-Carboline.....</b>	<b>56</b>
5.1	Einleitung.....	56
5.2	Vorkommen von $\beta$ -Carbolinen in Pflanzen und Lebensmitteln.....	57
5.3	Vorkommen von $\beta$ -Carbolinen in Säugern.....	61
5.3.1	Endogene Bildung und Aufnahme über die Nahrung .....	62
5.3.2	$\beta$ -Carboline als Biomarker .....	63
5.4	Pharmakologische Wirkungen der $\beta$ -Carboline .....	64
5.4.1	Genotoxizität .....	64
5.4.2	Neurotoxizität.....	65
5.4.3	Wechselwirkungen mit dem zentralen Nervensystem.....	66

<b>C</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>69</b>
<b>1</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>69</b>
<b>2</b>	<b>Etablierung der funktionellen Reporterassays .....</b>	<b>70</b>
<b>2.1</b>	<b>EGFP-Assay.....</b>	<b>71</b>
2.1.1	Basale und induzierbare EGFP-Gehalte .....	71
2.1.2	Optimierung der Inkubationstemperatur und zeitlicher Verlauf der EGFP-Expression .....	72
2.1.3	Charakterisierung des Ansprechens der H1G1.1c3 Zellen auf AhR Agonisten .....	74
2.1.4	Reproduzierbarkeit des EGFP-Assays.....	76
<b>2.2</b>	<b>Luciferase-Assay.....</b>	<b>77</b>
2.2.1	Basale und induzierbare Luciferase-Gehalte .....	77
2.2.2	Zeitlicher Verlauf der Luciferase-Expression.....	78
2.2.3	Charakterisierung des Ansprechens der H1L6.1c2 Zellen auf AhR Agonisten .....	79
2.2.4	Reproduzierbarkeit des Assays.....	81
<b>2.3</b>	<b>Einfluss der Serumkonzentration im Medium auf die Reporterexpression .....</b>	<b>81</b>
<b>2.4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>85</b>
<b>3</b>	<b>Identifizierung und Charakterisierung von <math>\beta</math>-Carbolinderivaten als AhR Liganden mittels funktioneller Reporterassays .....</b>	<b>88</b>
<b>3.1</b>	<b>Einführung.....</b>	<b>88</b>
<b>3.2</b>	<b>Screening von <math>\beta</math>-Carbolinen und Derivaten.....</b>	<b>89</b>
<b>3.3</b>	<b>Charakterisierung der <math>\beta</math>-Carboline hinsichtlich ihrer Ligandenaktivitäten.....</b>	<b>94</b>
3.3.1	Charakterisierung agonistisch wirkender $\beta$ -Carboline .....	94
3.3.2	Charakterisierung antagonistisch wirkender $\beta$ -Carboline .....	100
3.3.3	Überblick über das agonistische und antagonistische Potential ausgewählter $\beta$ -Carboline .....	102
<b>3.4</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>104</b>
<b>4</b>	<b>Charakterisierung von <math>\beta</math>-Carbolinen als Liganden des Ah Rezeptors mittels Gelretardation Assays.....</b>	<b>109</b>
<b>4.1</b>	<b>Einführung.....</b>	<b>109</b>
<b>4.2</b>	<b>GRA mit Meerschweinchen-Lebercytosol .....</b>	<b>110</b>
<b>4.3</b>	<b>GRA mit Zellkernextrakten .....</b>	<b>115</b>
<b>4.4</b>	<b>Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>117</b>

<b>5</b>	<b>Screening von Lebensmitteln auf ihre AhR Ligandenaktivität.....</b>	<b>122</b>
5.1	Einführung.....	122
5.2	Screening von Soja- und Würzsaucen.....	123
5.3	Screening einer fraktionierten Sojasauce .....	128
5.4	Diskussion der Ergebnisse.....	132
<b>D</b>	<b>EXPERIMENTALTEIL.....</b>	<b>135</b>
<b>1</b>	<b>Material .....</b>	<b>135</b>
1.1	Chemikalien.....	135
1.2	Untersuchungsmaterial .....	135
1.3	Säulenchromatographie.....	135
1.4	Membranfiltration .....	135
1.5	Zelllinien .....	136
1.6	Zellkulturbedarf.....	136
1.7	Material für die Gelretardation Assays (GRA).....	137
1.8	Pufferherstellung.....	139
1.9	Proteinbestimmung.....	140
<b>2</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>141</b>
2.1	Fluoreszenz-, Lumineszenz- und UV-Messgeräte .....	141
2.2	Gelchromatographie.....	141
2.3	Gel-Auswertung .....	141
2.4	Zentrifugen .....	142
2.5	Sonstige Geräte.....	142
2.6	Fliessinjektionsanalyse mit MS-Detektion.....	142
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>143</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellkulturmethoden .....</b>	<b>143</b>
3.1.1	Kultivierung und Passagieren der Zelllinien H1L6.1c2 (Luciferase-Zellen) und H1G1.1c3 (EGFP-Zellen).....	143
3.1.2	Auftauen und Kryokonservierung der Zellen.....	144
3.1.3	Ermittlung der Zellzahl .....	144
<b>3.2</b>	<b>Reportergenassays .....</b>	<b>144</b>
3.2.1	EGFP-Reportergenassay.....	145
3.2.2	Luciferase-Reportergenassay .....	146
<b>3.3</b>	<b>Methoden zum Gelretardation Assay (GRA).....</b>	<b>147</b>
3.3.1	Durchführung des Gelretardation Assays (GRA).....	147

3.3.2	Gelretardation Assay mit Cytosol.....	148
3.3.3	Gelretardation Assay mit Zellkernextrakten.....	150
3.3.4	Herstellung von <sup>32</sup> P-markieren Doppelstrang-Oligonukleotiden für die Gelretardation Assays .....	150
<b>3.4</b>	<b>Präparieren von Zellkernextrakten aus kultivierten Zellen.....</b>	<b>152</b>
<b>3.5</b>	<b>Bestimmung der Proteinkonzentration .....</b>	<b>155</b>
3.5.1	Proteinbestimmung nach Bradford .....	155
3.5.2	Proteinbestimmung mittels Fluorescamin-Assay.....	155
<b>3.6</b>	<b>Fraktionierung der Sojasoße.....</b>	<b>155</b>
<b>3.7</b>	<b>Auswertung .....</b>	<b>156</b>
<b>E</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>157</b>

# Abkürzungen

Å	Ångström
A $\alpha$ C	2-Amino-9 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i> ]indol
Abb.	Abbildung
Abs	Absorption
Ah	Aryl hydrocarbon, aromatische Kohlenwasserstoffe
AhR	Aryl hydrocarbon receptor, Rezeptor für aromatische Kohlenwasserstoffe
AhRR	Aryl hydrocarbon receptor repressor, AhR Repressor Protein
Ala	Alanin
Arnt	„Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ Protein
Asn	Asparagin
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BNF	$\beta$ -Naphthoflavon
BSA	bovine serum albumine, Rinderserumalbumin
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
Ci	Curie
CoA	Coenzym A
cpm	counts per minute, Zerfälle pro Minute
CYP1A1	Cytochrom P450 1A1
Da	Dalton
dest. H <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DIM	3,3'-Diindolylmethan
4,8-diMeIQx	2-Amino-3,4,8-trimethyl-3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoxalin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DRE	dioxin responsive element, Dioxin-responsives Element
DTT	Dithiothreitol
EC <sub>50</sub>	Effektive Konzentration eines Stoffes, bei der bei 50 % der Versuchsindividuen eine (biochemische) Wirkung beobachtet wird
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	„enhanced“ grünfluoreszierendes Protein
EROD	Ethoxyresorufin-O-deethylase

ESI	Elektrospray-Ionisierung
FICZ	6-Formyl-indolo-[3,2-b]-carbazol
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
G418	Geneticin
GFP	green fluorescent protein, grünfluoreszierendes Protein
Glu-P-1	2-Amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
Gly	Glycin
GRA	gel retardation assay, Gelretardation Assay
h	Stunde
HAH	halogenated aromatic hydrocarbon, halogener aromatischer Kohlenwasserstoff
HCA	heterocyclic amines, heterozyklische Amine
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HIF	Hypoxia inducible factor, Hypoxie-induzierbarer Transkriptionsfaktor
His	Histidin
HPLC	high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigchromatographie
HR-GC-MS	high resolution gas chromatography mass spectrometry, Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
I3C	Indol-3-carbinol
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICZ	Indolo[3,2b]carbazol
IC <sub>50</sub>	inhibition concentration at 50 %; Konzentration eines Stoffes, bei der eine 50 %ige Inhibierung einer (biochemischen) Wirkung auftritt
Ile	Isoleucin
IQ	2-Amino-3-methyl-3 <i>H</i> -imidazo[4,5-f]quinolin
k	kilo-
Konz.	Konzentration
l	Liter
Leu	Leucin
LD <sub>50</sub>	Dosis eines Stoffes, die bei einmaliger Gabe den Tod der Hälfte (50 %) der Versuchsindividuen zur Folge hat
Log	Logarithmus
Luc	Luciferase
μ	mikro-
M	mol/l, frühere Bezeichnung: „Molarität“

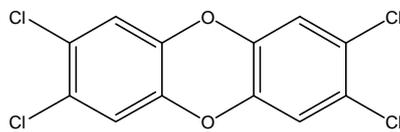
MAO	Monoaminoxidase
MCS	multiple cloning site, multiple Klonierungsstelle
MDL	minimal detection limit, minimales Detektionslimit
MeIQx	2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxalin
MeA $\alpha$ C	2-Amino-3-methyl-9 <i>H</i> -pyrido[2,3-b]indol
MEM	Minimum Essential Medium
Me-THF	Methyltetrahydrofolat
Met	Methionin
min	Minute
m	milli-
mol	Mol
MPP <sup>+</sup>	<i>N</i> -Methyl-4-phenylpyridinium-Ion
MPTP	<i>N</i> -Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure, Boten-RNA
MS	Massenspektrometrie
n	nano-
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NES	nuclear export signals, Kernexportsignale
NF $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B, nukleärer Transkriptionsfaktor $\kappa$ B
NLS	nuclear localization signals, Kernlokalisationsignale
n.s.	nicht signifikant
p	pico-
PAS	<b>Per-Arnt-Sim-Proteine</b>
PAH	polycyclic aromatic hydrocarbon, polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCB	polychlorierte Biphenyle
PCDD	polychlorierte Dibenzo- <i>p</i> -dioxine
PCDF	polychlorierte Dibenzofurane
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin
Pen/Strp	Penicillin/Streptomycin
Per	„Period“-Protein
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandin G <sub>2</sub>
Phe	Phenylalanin
ppb	parts per billion
Q	Glutamin
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship, Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehung
RAR	retinoic acid receptor, Retinsäure-Rezeptor

RXR	retinoid X receptor, Retinoid-X-Rezeptor
RP18	Reversed Phase mit C <sub>18</sub> -Alkylresten
rpm	revolution per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction, Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
Ser	Serin
Sim	„Single-minded“ Protein
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THC	1,2,3,4-Tetrahydro-β-carbolin
THCC	1,2,3,4-Tetrahydro-β-carbolin-3-carbonsäure
THF	Tetrahydrofolat
Thr	Threonin
4,7,8-triMeIQx	2-Amino-3,4,7,8-tetramethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoxalin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
Trp-P-1	3-Amino-1,4-dimethyl-5 <i>H</i> -pyrido[4,5-b]indol
Trp-P-2	3-Amino-1-methyl-5 <i>H</i> -pyrido[4,5-b]indol
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
Tyr	Tyrosin
U	Unit (μmol/min)
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
Val	Valin
vgl.	vergleiche
XRE	xenobiotic responsive element, Fremdstoff-responsives Element
z. B.	zum Beispiel

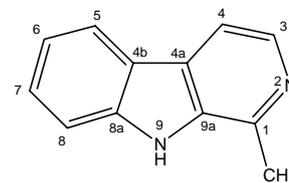


# Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden Studien zur Identifizierung und Charakterisierung von Lebensmittelinhaltsstoffen als natürliche Liganden des Ah Rezeptors („aryl hydrocarbon receptor“) vorgestellt. Der Ah Rezeptor ist ein liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor, der an der Expression zahlreicher Metabolismusenzyime beteiligt ist. Im Mittelpunkt unserer Untersuchungen anhand von funktionellen AhR-abhängigen Bioassays stand dabei die Klasse der  $\beta$ -Carboline und ihrer Derivate, deren natürliches Vorkommen bereits in zahlreichen Lebensmitteln und im menschlichen Organismus beschrieben ist. Die  $\beta$ -Carboline wurden für die Untersuchung auf ihr mögliches AhR Ligandenpotential ausgewählt, da sie von der Aminosäure Tryptophan abgeleitet sind, die selbst als schwacher AhR Agonist identifiziert wurde, und weil das trizyklische 9H-Pyridol[3,4-b]-Ringsystem der  $\beta$ -Carboline eine strukturelle Ähnlichkeit zum prototypischen AhR Liganden 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) aufweist.



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



Harman

Die Schwerpunkte der Untersuchungen zur AhR Ligandenaktivität von  $\beta$ -Carbolen lagen auf folgenden Aspekten:

- Etablierung von rekombinanten, zellbasierten funktionellen Reporterassays;
- Identifizierung und Charakterisierung von  $\beta$ -Carbolinderivaten als Liganden des Ah Rezeptors mittels funktioneller Reporterassays;
- Charakterisierung mechanistischer Aspekte im AhR vermittelten Signaltransduktionsweg mittels *in vitro* und *ex vivo* Gelretardation Assays am Beispiel ausgewählter  $\beta$ -Carbolinderivate mit AhR Ligandenaktivität und
- Beschreibung der AhR Ligandenaktivität von Soja- und Würzsaucen als Modellsysteme für komplexe natürliche Lebensmittel.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst zwei **rekombinante, zellbasierte Reporter-genassays** zur Identifizierung von AhR Liganden etabliert. Bei diesen Bioassays handelte es sich um die von der Mausleberzelllinie Hepa1c1c7 abgeleiteten Klone H1L6.1c2 und H1G1.1c3, die stabil transfizierte Reporter gene für Luciferase und EGFP („enhanced green fluorescent protein“) enthielten. Die Expression der Reporterproteine Luciferase und EGFP stand unter der Kontrolle von so genannten „dioxin responsive elements“ (DRE, Dioxin-responsive Elemente) und unterlag somit einem AhR vermittelten Signaltransduktionsmechanismus. Funktionsfähigkeit und Zweckmäßigkeit des Luciferase- (CALUX-Assay, „chemically activated luciferase expression“) sowie des EGFP-Assays (CAFLUX, „chemically activated fluorescence expression“) konnten mittels Untersuchungen zu den basalen und induzierbaren Reporterproteingehalten und durch Aufnahme von Dosis-Wirkungskurven für die in der Literatur beschriebenen AhR Agonisten  $\beta$ -Naphthoflavon (BNF) und 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) gezeigt werden. Die Reporter genassays erlaubten eine einfache, zuverlässige und empfindliche Identifizierung, Charakterisierung und relative Quantifizierung von AhR Liganden. Aufgrund von Unterschieden in Reporterproteinstabilität und Geschwindigkeit der Genexpression boten beide Reporter gensysteme spezifische Vorteile, sodass zu einer möglichst umfassenden Identifizierung und Charakterisierung von AhR Liganden beide Assays komplementär eingesetzt wurden. Die mittels EGFP-Reporter genassay ermittelten  $EC_{50}$ -Werte betragen für TCDD 25  $\mu$ M und für den weniger toxischen Referenzliganden  $\beta$ -Naphthoflavon 35 nM. Diese Werte korrelierten sehr gut mit den  $EC_{50}$ -Werten von 77  $\mu$ M für TCDD und 14 nM für BNF im Luciferase-Bioassay, sowie mit publizierten Werten.

Ausgangsmaterial für erste umfangreiche **Screeninguntersuchungen zur AhR Ligandenaktivität von  $\beta$ -Carbolinderivaten** waren die von Tryptophan abgeleiteten klassischen  $\beta$ -Carboline, 1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -carboline, 1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-3-carbonsäuren, sowie Tryptophan-Glykokonjugate. Das Screening mittels EGFP-Reporter genassay führte zur Identifizierung mehrerer  $\beta$ -Carbolinderivate, die fähig waren die AhR-kontrollierte Reporter genexpression zu induzieren bzw. die durch einen Agonisten induzierte Genexpression zu inhibieren. Insbesondere die  $\beta$ -Carboline  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester und -ethylester sowie  $\beta$ -Carbolin-3-N-methylcarboxamid wiesen ein ausgeprägtes agonistisches Potential auf. Hingegen konnten Harman (1-Methyl- $\beta$ -carbolin) und Norharman ( $\beta$ -Carbolin) die EGFP-Reporter gen-

expression nicht induzieren. Bei Koinkubation mit dem Agonisten BNF waren beide Harmanalkaloide jedoch fähig die durch BNF induzierte Genexpression zu schwächen.

An diese erste Identifizierung von  $\beta$ -Carbolinderivaten mit AhR Ligandenaktivität schloss sich eine eingehende Charakterisierung exemplarischer Vertreter von  $\beta$ -Carbolinen mit agonistischen bzw. antagonistischen Eigenschaften an. Hierzu wurden Studien zum zeitlichen Verlauf und zur Serumabhängigkeit der Reporterexpression im EGFP- und Luciferase-Assay durchgeführt. Darüber hinaus ermöglichten **Dosis-Wirkungs- und Antagonist-Inhibierungskurven** die Ermittlung von  $EC_{50}$ - und  $IC_{50}$ -Werten für die Ligandenaktivität verschiedener  $\beta$ -Carboline. Für die Verbindungen  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester und -ethylester sowie  $\beta$ -Carbolin-3-N-methylcarboxamid wurden im EGFP-Assay anhand von Dosis-Wirkungskurven  $EC_{50}$ -Werte von 13  $\mu$ M, 11  $\mu$ M und 17  $\mu$ M ermittelt. Diese  $\beta$ -Carboline stellten somit deutlich schwächere Agonisten als die Liganden TCDD ( $EC_{50}$ : 25 pM) und BNF ( $EC_{50}$ : 35 nM) dar. Im Vergleich mit dem bekannten natürlichen AhR Agonisten Tryptophan ( $EC_{50}$ : 135  $\mu$ M), der in analoger Weise untersucht wurde und als schwacher Agonist einzuordnen ist, wiesen die untersuchten  $\beta$ -Carboline ein geringfügig stärkeres agonistisches Potential auf.

Durch Koinkubationen mit dem AhR Agonisten BNF konnten die  $\beta$ -Carboline Harman, Norharman, Harmalin und Harmin im EGFP-Reporterassay eindeutig als Antagonisten des AhR vermittelten Signaltransduktionswegs identifiziert werden. Die für diese Verbindungen durch Antagonist-Inhibierungskurven ermittelten  $IC_{50}$ -Werte von 7  $\mu$ M, 9  $\mu$ M, 21  $\mu$ M bzw. 6  $\mu$ M lagen im unteren  $\mu$ M-Bereich und wiesen ein ähnlich starkes antagonistisches Potential wie der bekannte AhR Antagonist Ellipticin ( $IC_{50}$ : 13  $\mu$ M) auf. Anhand unserer Untersuchungen mit funktionellen Reporterassays konnten wir folglich belegen, dass ausgewählte Vertreter aus der Klasse der  $\beta$ -Carboline AhR Ligandenaktivität besitzen. Des Weiteren wurde die agonistische bzw. antagonistische Wirkung dieser Verbindungen systematisch charakterisiert.

Die unterschiedlichen agonistischen und antagonistischen Wirkprofile der identifizierten AhR Liganden veranlassten uns, Untersuchungen zum mechanistischen Ablauf der AhR vermittelten Genexpression durchzuführen. Während die EGFP- und Luciferase-Reporterassays den korrekten und vollständigen Ablauf des AhR vermittelten Signaltransduktionsmechanismus bis zur Genexpression beschreiben,

ermöglichen es **DNA-Bindungsassays (Gelretardation Assay, GRA)** speziell die ligand-abhängige Aktivierung und die Transformation des AhR-Ligand-Komplexes in seine DNA-Bindungsform zu untersuchen. Ziel unserer Studien mit Gelretardation Assays war es, durch die Analyse von Einzelschritten des AhR vermittelten Regulationsmechanismus zu klären, auf welcher Stufe dieser Mechanismus bei den antagonistisch wirkenden  $\beta$ -Carbolinen abgebrochen wird und gleichzeitig den korrekten Ablauf des AhR kontrollierten Signalwegs bei den agonistisch wirkenden  $\beta$ -Carbolinen zu belegen. Hierzu setzten wir im *in vitro* GRA Meerschweinchen-Lebercytosol als AhR Quelle ein, während wir im *ex vivo* GRA die AhR-Ligand-Komplexe durch Inkubation kultivierter Zellen und Extraktion der Zellkernproteine gewannen.

Für die Verbindung Carbolin-3-carbonsäure-methylester konnte in beiden Gelretardation Assays die Ausbildung der entsprechenden AhR-Ligand-DNA-Komplexbande gezeigt und somit die Fähigkeit dieser Verbindung die Transformation des Ah Rezeptors in seine hoch-affine DNA-Bindungsform zu induzieren belegt werden. Es bestand eine sehr gute Korrelation der Fähigkeit dieses  $\beta$ -Carbolins den AhR zu transformieren, mit der Fähigkeit die AhR-abhängige Genexpression in intakten Zellen zu induzieren. Hinsichtlich des  $\beta$ -Carbolins Harman traten zwischen den Ergebnissen des *in vitro* und des *ex vivo* GRAs jedoch Differenzen auf: Während der *in vitro* GRA belegte, dass Harman prinzipiell in der Lage ist die Aktivierung und Transformation des Ah Rezeptors zu induzieren, konnte im *ex vivo* GRA keine Komplexbildung in Gegenwart von Harman nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit denen der *in vivo* Reportergenassays, wo Harman ebenfalls nicht fähig war die AhR-abhängige Genexpression zu induzieren. In Koinkubationsexperimenten unterdrückte Harman die Ausbildung der hoch-affinen DNA-Bindungsform der AhR-TCDD-Komplexe und bewirkte eine deutliche Schwächung der durch TCDD induzierten AhR-Ligand-DNA-Komplexbande. Die aufgetretenen Differenzen zwischen dem *in vitro* GRA und dem *ex vivo* GRA könnten sowohl auf spezies-spezifische Effekte und Unterschiede in Transport und Bindung der Testsubstanzen am Ah Rezeptor zurückzuführen sein, als auch im Zusammenhang mit metabolischen Abbauprozessen im *ex vivo* Test stehen.

Zusammenfassend zeigten unsere Ergebnisse der *in vitro* und *ex vivo* Gelretardation Assays sowie die Resultate der funktionellen Reportergenassays, dass verschiedene

$\beta$ -Carboline wie z. B.  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester die Transformation der entsprechenden AhR-Ligand-Komplexe in ihre hoch-affine DNA-Bindungsform induzierten und die AhR-abhängige Genexpression aktivierten. Diese Verbindungen wurden somit als Agonisten des Ah Rezeptors eingeordnet. Die  $\beta$ -Carboline Harman und Norharman wiesen in allen Assays übereinstimmend ein ausgeprägtes antagonistisches Potential auf, da sie sowohl die durch TCDD stimulierte AhR Transformation, als auch die Genexpression inhibierten. Werden die Ergebnisse des *in vitro* GRA isoliert betrachtet, können Harman und Norharman als partielle Agonisten eingeordnet werden. Jedoch besitzen die verschiedenen *in vivo* bzw. *ex vivo* Bioassays hinsichtlich Detektion und Charakterisierung von AhR Agonisten und Antagonisten eine höhere Aussagekraft als der *in vitro* GRA, da sie die Bedingungen in intakten Zellsystemen besser wiedergeben. Harman und Norharman waren demzufolge als AhR Liganden mit antagonistischer Aktivität einzuordnen. Die durchgeführten GRA-Experimente ermöglichten auch die Schlussfolgerung, dass die antagonistischen Effekte im Falle des  $\beta$ -Carbolins Harman im AhR Signalweg bereits auf der Stufe der AhR Transformation und DNA-Bindung stattfanden und nicht auf eine fehlerhafte oder unterbundene Transkription der DRE-kontrollierten Gene zurückzuführen waren.

Zusätzlich wurden im Rahmen dieser Arbeit Studien zur **AhR Ligandenaktivität von komplexen Lebensmitteln** durchgeführt. Ziel dieser Untersuchungen war es, die Relevanz von natürlichen AhR Liganden, die bisher nur als isolierte Einzelverbindungen charakterisiert wurden, auch in komplexen Mischungen, wie Lebensmitteln, darzustellen. Zur Untersuchung anhand funktioneller EGFP- und Luciferase-Reporterassays wurden verschiedene Soja- und Würzsaucen aus dem lokalen Handel herangezogen. Die Ergebnisse des Screenings auf AhR Ligandenaktivität belegten das Vorkommen sowohl von AhR Agonisten, als auch von AhR Antagonisten in verschiedenen Würz- und Sojasaucen, die als Modellsysteme für die komplexe Zusammensetzung von Lebensmitteln ausgewählt wurden. Gleichzeitig spiegelten sie die Gesamtheit der in den Proben vorkommenden agonistischen und antagonistischen Aktivitäten wider und gaben einen ersten Einblick in das Wechselspiel von AhR Liganden in komplexen Mischungen. Die Screeningergebnisse für die fraktionierte Sojasauce belegten außerdem, dass auch polare Inhaltsstoffe als AhR Agonisten wirken und insbesondere starke antagonistische Aktivität aufweisen können. Obwohl die Identität der AhR aktivierenden und inhibierenden Verbindungen in diesen Lebens-

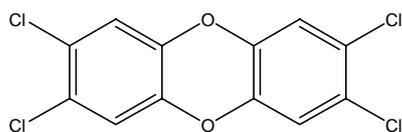
mitteln noch weitgehend ungeklärt ist, zeigten unsere Ergebnisse und die anderer Arbeitsgruppen (Amakura et al., 2002; Jeuken et al., 2003), dass AhR Liganden in Lebensmittelsprodukten weit verbreitet sind und dass diese für den Menschen als eine wichtige Quelle für AhR Liganden anzusehen sind.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die eingesetzten Reporterassays einen wichtigen Beitrag zu bioassay-gestützten Fraktionierungsprozeduren leisten können, die auf die Isolierung und Charakterisierung bisher unbekannter polarer und unpolarer AhR Liganden in Lebensmitteln abzielen. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die rekombinanten Reporterassays nicht nur zur Detektion und relativen Quantifizierung von Dioxinen und verwandten halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen in Umweltproben wie Serum, Flugasche und Boden geeignet sind, sondern auch den Nachweis von natürlichen AhR Liganden in Lebensmitteln ermöglichen. Die Reporterassays sind für diese Untersuchungen besonders geeignet, da sie den gesamten Ablauf des AhR vermittelten Signalwegs von Aufnahme in die Zelle, Bindung an den Rezeptor, Translokation in den Zellkern, Transformation in DNA-Bindungsform, Bindung an spezifische DNA-Elemente und Transkription der nachgeschalteten Gene abdecken.

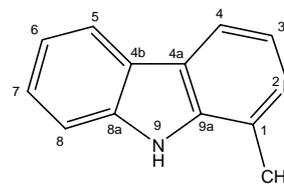
Unsere Studien zum AhR Ligandenpotential von  $\beta$ -Carbolinen und Derivaten lieferten zusätzliche Einblicke in das breite Spektrum von Verbindungen, die fähig sind den AhR Signaltransduktionsweg zu aktivieren. Es kann damit als gesichert angesehen werden, dass verschiedene  $\beta$ -Carboline sowie Lebensmittelproben prinzipiell über den AhR vermittelten Signalweg den Xenobiotika-Metabolismus modulieren können. Die biologisch-toxikologische Relevanz von Einzelverbindungen oder Lebensmitteln *in vivo* bleibt noch zu untersuchen und stellt ein attraktives Aufgabengebiet für Folgestudien dar.

## Summary

This research summarizes studies on the identification and characterization of compounds present in food samples, which can act as ligands of the aryl hydrocarbon receptor (Ah receptor, AhR). The Ah receptor represents a ligand-dependent transcription factor and is involved in the expression of various enzymes of the xenobiotic metabolism. Our analyses using functional AhR-dependent bioassays were focusing on  $\beta$ -carbolines and their derivatives. These compounds have been described to be naturally occurring in foods and in the human body. The  $\beta$ -carbolines were chosen to be evaluated for their potential to act as AhR ligands because they are derived from the amino acid tryptophan, which is a weak AhR agonist itself, and due to their structural resemblance to the tricyclic 9*H*-pyridol[3,4-*b*] ring system of the  $\beta$ -carbolines to the prototypic AhR ligand 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD).



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



harman

As the main focus of our studies was to evaluate the capacity of  $\beta$ -carbolines to act as AhR ligands, our studies covered the following aspects:

- Establishment of recombinant, cell-based functional reporter gene assays;
- Identification and characterization of  $\beta$ -carboline derivatives as ligands of the AhR by the means of functional reporter gene assays;
- Characterization of mechanistic aspects in the AhR-mediated signal transduction pathway of distinct  $\beta$ -carboline derivatives acting as AhR ligands using *in vitro* and *ex vivo* gelretardation assays; and
- Description of the AhR ligand activities of soy and seasoning sauces, representing model systems for complex and natural food products.

Within the scope of this work two **cell-based reporter gene assays** were initially adapted for the identification (and characterization) of naturally occurring food compounds which may act as AhR ligands. These functional assays were based on the

clones H1L6.1c2 und H1G1.1c3 of the mouse liver cell line Hepa1c1c7, which contained stably transfected reporter genes for luciferase and EGFP (enhanced green fluorescent protein) respectively. The expression of the reporter proteins was controlled by the so called dioxin responsible elements (DRE) and therefore the gene expression was initiated by the AhR-mediated signal transduction pathway. The efficiency and usefulness of the luciferase and EGFP reporter gene assays (also called CALUX assay, „chemically activated luciferase expression“ or CAFLUX assay, „chemically activated fluorescence expression“ respectively) was demonstrated by studying the basal and inducible contents of reporter proteins in treated cells and by dose-response curves of the well known AhR agonists  $\beta$ -naphthoflavone (BNF) und 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). The reporter gene assays provided an opportunity for the simple, reliable and sensitive identification, characterization and relative quantification of AhR ligands. Due to differences in reporter protein stability and kinetics of gene expression both reporter gene systems offered specific advantages, so that both assays were used complementary for the identification and characterization of agonists and antagonists. The EC<sub>50</sub> values determined using the EGFP reporter gene assay were 25 pM for TCDD and 35 nM for the less toxic reference ligand  $\beta$ -naphthoflavone (BNF). These values correlated well with the EC<sub>50</sub> values of 77 pM for TCDD and 14 nM for BNF using the luciferase assay, as well as with values published in the literature.

For the extensive **screening studies to characterise the AhR ligand activity of  $\beta$ -carboline derivates** the classical  $\beta$ -carbolines, 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolines, 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acids, as well as tryptophan-glycoconjugates were selected. The screening using the EGFP reporter gene assay led to the identification of several  $\beta$ -carboline derivatives that were capable of inducing the AhR-mediated reporter gene expression or inhibiting the gene expression triggered by an agonist, respectively. In particular, the compounds  $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid methylester and -ethylester, as well as  $\beta$ -carboline-3-N-methyl-carboxamide exhibited a distinct agonistic activity. In contrast, harman (1-methyl- $\beta$ -carboline) and norharman ( $\beta$ -carboline) could not induce the EGFP expression. Co-incubations of harman and norharman with the agonist BNF showed that these  $\beta$ -carbolines were able to reduce the gene expression induced by BNF.

These first identification studies of  $\beta$ -carboline derivatives with AhR ligand activity were followed by detailed characterization of exemplary representatives of the

$\beta$ -carbolines with agonistic or antagonistic characteristics. For this purpose studies of the time course and dependence on serum levels in the test medium of the reporter gene assays were conducted. In addition, **dose-response curves and antagonist-inhibition curves** enabled us to determine the characteristic  $EC_{50}$ - and  $IC_{50}$  values for the ligand activity of diverse  $\beta$ -carbolines. Using the EGFP assay, the compounds  $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid methylester,  $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid ethylester and  $\beta$ -carboline-3-N-methylcarboxamide exhibited  $EC_{50}$  values of 13  $\mu$ M, 11  $\mu$ M and 17  $\mu$ M respectively. These  $\beta$ -carbolines represented AhR agonists, that were clearly weaker than the ligands TCDD ( $EC_{50}$ : 25 pM) and BNF ( $EC_{50}$ : 35 nM). In contrast to the natural AhR agonist tryptophan ( $EC_{50}$ : 135  $\mu$ M), which was classified as a weak agonist, the studied  $\beta$ -carbolines exhibited a slightly stronger agonistic activity. Using the EGFP assay, co-incubations with the AhR agonist BNF led to the identification of harman, norharman, harmalin und harmin as antagonists of the AhR mediated signal transduction pathway. The  $IC_{50}$  values obtained from antagonist-inhibition curves were 7  $\mu$ M, 9  $\mu$ M, 21  $\mu$ M and 6  $\mu$ M, respectively. Therefore, these  $\beta$ -carbolines exhibited an antagonistic activity, which was similar in strength to the well known AhR antagonist ellipticine ( $IC_{50}$ : 13  $\mu$ M). On the basis of our studies with functional reporter gene assays we could prove, that distinct representatives of the  $\beta$ -carbolines possessed AhR ligand activity, and we could also characterize their agonistic and antagonistic effects systematically.

The differences in the agonistic and antagonistic profile of the identified AhR ligands among the  $\beta$ -carbolines led to the examination of mechanistic aspects of AhR-mediated gene expression. While the EGFP and luciferase reporter gene assays described the accurate and complete course of the AhR mediated signal transduction pathway, **DNA-binding assays (gel retardation assays, GRA)** allowed the examination of the ligand-dependent activation and transformation of the AhR-ligand-complexes to their DNA-binding form. The goal of these studies was to analyse individual steps of the AhR mediated mechanism of regulation, in order to find out which step was responsible for the abortion of the mechanism in the case of  $\beta$ -carbolines with antagonistic characteristics, and to prove the accurate course of the mechanism for  $\beta$ -carbolines acting as AhR agonists. For this purpose we used guinea pig liver cytosol as the source of AhR proteins for the *in vitro* GRA, while for the *ex vivo* GRA, the AhR-ligand-complexes were gained from treated cultivated cells and the subsequent extraction of their nuclear proteins. It was demonstrated in both gel retardation assays that, for

example,  $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid methylester caused the formation of the AhR-ligand-DNA-complex band. Thus, this  $\beta$ -carboline is capable to induce the transformation of the AhR complex to its DNA-binding form. There was a good correlation between the ability of this  $\beta$ -carboline to transform the AhR complex and the ability to induce the AhR-dependent gene expression in intact cells. Regarding the  $\beta$ -carboline harman, differences between the *in vitro* and *ex vivo* GRAs were observed: While the *in vitro* GRA showed that harman is, in principle, able to induce the transformation of the AhR, harman could not cause the formation of the AhR-ligand-DNA-complex band in the *ex vivo* gel retardation assay. These results corresponded to those of the *in vivo* reporter gene assays, as harman could not induce the AhR-dependent gene expression in those cases. As expected, harman caused a significant reduction of the AhR-ligand-DNA-complex band induced by TCDD in co-incubation experiments and therefore suppressed the formation of the DNA-binding form of the AhR-TCDD-complexes. The observed differences between the *in vitro* and the *ex vivo* GRA could be explained by species-specific effects and by different bioavailability of the test compound at the AhR. But they could also be associated with metabolic degradation processes in the *ex vivo* system.

In conclusion, our results of the *in vitro* and *ex vivo* gel retardation assays, as well as those of the functional reporter gene assays, showed that various  $\beta$ -carbolines induced the transformation of the respective AhR-ligand-complexes to their DNA-binding form and also induced the AhR-dependent gene expression. These compounds were classified as agonists of the Ah receptor. The  $\beta$ -carbolines harman and norharman exhibited in all assays a distinct antagonistic activity, as they inhibited the AhR transformation and gene expression stimulated by TCDD. When considering only the results of the *in vitro* GRA, harman and norharman could be regarded as partial AhR agonists. However, the different *in vivo* and *ex vivo* bioassays have a higher significance regarding the detection and characterisation of AhR agonists and antagonists than the *in vitro* GRA. Because those assays represent the conditions of intact cell systems, harman and norharman were ultimately classified as AhR ligands with antagonistic characteristics. The GRA experiments conducted in this work also allowed the conclusion, that in the case of harman the antagonistic effect took place at the stage of transformation and DNA-binding and could not be attributed to deficient transcription of the genes controlled by dioxin-responsive elements.

In addition, the **AhR ligand activity of some complex food products** was evaluated. The aim of these studies was to demonstrate the relevance of natural AhR ligands in complex mixtures like foods. Various soy and seasoning sauces, obtained from local stores, were chosen as model systems and were examined by EGFP and luciferase reporter gene assay. The results of this screening proved the occurrence of AhR agonists and antagonists in those samples. At the same time the data represented the combined agonistic and antagonistic activities in the samples and gave a first insight into the interaction of AhR ligands in complex mixtures. Furthermore, the screening results showed that polar food compounds could be identified as AhR ligand, exhibiting particularly antagonistic effects. Although the identity of those substances with AhR activating and suppressing characteristics has not yet been established, our results and those of other groups (Amakura et al., 2002; Jeuken et al., 2003) showed that AhR ligands are widely present in food products, which could be regarded as an important source for AhR ligands for humans.

Finally, it can be stated that the reporter gene assays used in this work, could contribute significantly to bioassay-based fractionating procedures aiming at the detection, isolation and characterization of polar and non-polar AhR ligands in biological samples like foods. Our results showed that the recombinant reporter gene assays were not only useful for the detection and relative quantification of dioxins and related halogenated aromatic hydrocarbons, but also allowed the detection of natural AhR ligands in foods. The reporter gene assays were especially suitable for this purpose because they covered the whole course of the AhR-mediated signal transduction pathway including the uptake into cells, binding to the receptor, translocation into the nucleus, transformation to the DNA-binding form, binding to specific elements of the DNA and transcription of the corresponding genes.

In summary, our studies on the capability of various  $\beta$ -carboline and their derivatives to act as AhR ligands provided additionally insights into the broad spectrum of substances that are able to activate the AhR signal transduction pathway. Therefore, some representatives of the  $\beta$ -carboline, as well as food samples, can in principle modulate the xenobiotic metabolism through the AhR signaling pathway, even though many biological and toxicological details remain to be established *in vivo*.



# A Einleitung

Die Toxizität vieler chemischer Agenzien lässt sich auf eine unspezifische Schädigung der Funktion der Zellen und des Organismus zurückführen. Daneben gibt es jedoch zahlreiche toxische Verbindungen, die spezifische Reaktionen auslösen, welche die Gleichgewichte in physiologischen Regulationsprozessen und genetischen Programmen stören. Ein wesentlicher Angriffspunkt dieser toxischen, nicht zellschädigenden Substanzen ist die Modulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren auf zellulärer Ebene.

Transkriptionsfaktoren sind multifunktionelle Proteine, die die Induktion und in manchen Fällen auch die Repression der Gene steuern, an deren Promotoren sie binden. Die Erkennung und spezifische Bindung der Transkriptionsfaktoren an definierte DNA-Motive im Promotor der zu regulierenden Gene erfolgt über die sogenannte DNA-bindende Domäne. Transkriptionsfaktoren aus der Familie der liganden-abhängigen Transkriptionsfaktoren besitzen zusätzlich eine zweite Domäne, über die niedermolekulare Verbindungen oder Fremdstoffe gebunden werden. Durch die Bindung an die Transkriptionsfaktoren greifen diese Verbindungen in die Entscheidung ein, welche Gene in ihrer Expression induziert oder reprimiert werden.

Prominente Beispiele solcher liganden-abhängigen Transkriptionsfaktoren finden sich bei den Rezeptoren für klassische Steroidhormone wie Glucocorticoide, Östrogene, Gestagene und Mineralocorticoide. Funktionell ähnlich, aber strukturell völlig anderes aufgebaut ist der „aryl hydrocarbon“ (Ah) Rezeptor, der durch polyhalogenierte Dibenzo-*p*-dioxine und andere halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (HAHs) aktiviert wird (Göttlicher, 2004).

Der Ah Rezeptor als induzierbarer, liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor vermittelt ein breites Spektrum an biochemischen und toxischen Effekten im Organismus und ist für die Gesundheit sowie für Entwicklungsprozesse im Körper von großer Bedeutung. Kennzeichnend für die Liganden des Ah Rezeptors ist deren große strukturelle Heterogenität. Neben den Liganden aus der Klasse der polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxine (PCDDs) und polychlorierten Dibenzofurane (PCDFs), richtet sich die

wissenschaftliche Aufmerksamkeit in den letzten Jahren zunehmend auf die Identifizierung von Naturstoffen, die fähig sind den Ah Rezeptor (AhR) zu aktivieren und die AhR-abhängige Genexpression zu induzieren.

Ausgehend von der Beobachtung, dass die Aminosäure Tryptophan und verschiedene Tryptophan-Metabolite wie Tryptamin und Indollessigsäure als (schwache) Liganden des Ah Rezeptors wirken können (Heath-Pagliuso et al., 1998 und 2000), wurden im Rahmen dieser Arbeit Vertreter der von Tryptophan abgeleiteten  $\beta$ -Carboline auf ihre AhR Ligandenaktivität näher untersucht.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, natürlich vorkommende  $\beta$ -Carboline als AhR Liganden zu identifizieren und hinsichtlich ihrer agonistischen und / oder antagonistischen Aktivitäten zu charakterisieren. Dazu wurden vorrangig Bioassays mit Reportergenkonstrukten zum Nachweis der AhR-abhängigen Genexpression eingesetzt und diese mit Gelretardation Assays zur weiteren Charakterisierung der molekularen Mechanismen des AhR Signaltransduktionswegs kombiniert.

Aufgrund des beschriebenen Vorkommens von  $\beta$ -Carbolinen und weiterer natürlicher AhR Liganden in Lebensmitteln sollten anschließende Screeningstudien mittels der etablierten Reportergenassays neue Erkenntnisse zum Vorkommen von AhR Agonisten und Antagonisten und zu deren Zusammenspiel in „echten“ Lebensmitteln liefern.

# **B Kenntnisstand**

## **1 Der Aryl hydrocarbon Rezeptor**

### **1.1 Die Struktur des Aryl hydrocarbon Rezeptors**

Die Exposition gegenüber persistenten Umweltkontaminanten aus der Klasse der halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe (HAHs) führt bei Menschen und Tieren zu einer Vielzahl von gewebe-, geschlechts- und spezie-abhängigen toxischen und biochemischen Effekten. Zu diesen von polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxinen (PCDDs), polychlorierten Dibenzofuranen (PCDFs) und polychlorierten Biphenylen (PCBs) ausgelösten Effekten zählen Kanzerogenität, Immunotoxizität, das Auszehrungssyndrom und die Expression von Metabolismusenzyemen. Für eine ausführliche Beschreibung und Diskussion der toxischen und biochemischen Effekte sei auf Abschnitt B 3.1 verwiesen. Genetische und biochemische Untersuchungen zeigten, dass diese zellulären und biochemischen Reaktionen durch den so genannten „aryl hydrocarbon receptor“ (Ah Rezeptor, AhR) vermittelt werden (Poland und Knutson, 1982).

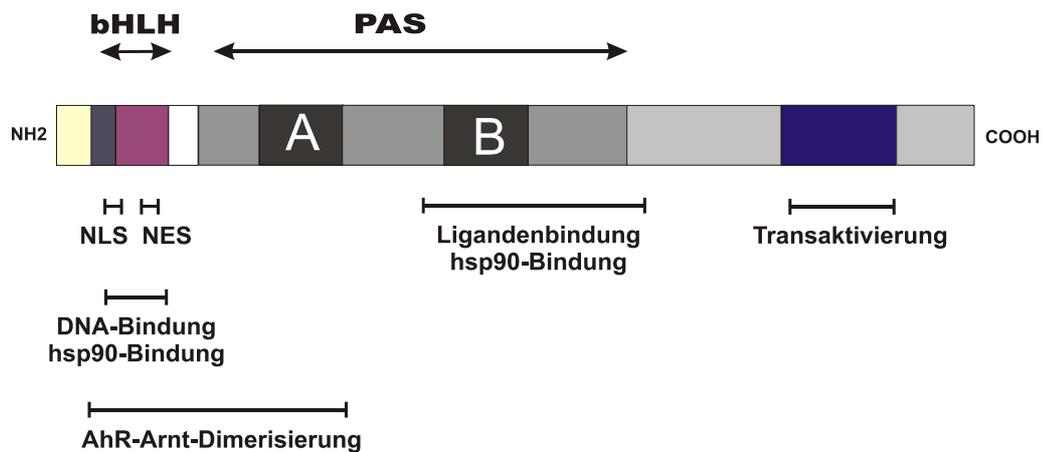
Erste genetische Studien zum Ah Rezeptor begannen mit der Beobachtung, dass die beiden durch Inzucht erzeugten Mäusestämme C57BL/6 und DBA/2N eine unterschiedlich starke Induktion der „Aryl Hydrocarbon Hydroxylase“, die mittlerweile als CYP1A1 bezeichnet wird, durch aromatische Kohlenwasserstoffe aufwiesen. Basierend auf diesen Beobachtungen schlugen Nebert und Mitarbeiter (1972) die Existenz von Genorten (Loci) mit unterschiedlicher Sensitivität für aromatische Kohlenwasserstoffe vor, die als „AhR responsiv“ und „AhR nicht-responsiv“ bezeichnet wurden. Durch den Einsatz von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) als prototypischem AhR Liganden konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit dem nicht-responsiven AhR Loci um den Faktor 10 schwächer responsiv waren als die Mäuse des als responsiv deklarierten Stamms (Poland und Glover, 1975). Die reduzierte Sensibilität wurde später auf eine verringerte Ligandenaffinität in Folge einer Mutation in der Ligandenbindungsdomäne

zurückgeführt (Ema et al., 1994; Chang et al., 1993). Poland und Knutson zeigten, dass die Leber der Maus ein Protein enthält, das fähig ist TCDD reversibel und mit hoher Affinität zu binden und das die Ligandenbindungseigenschaften eines Rezeptors aufweist. Das Protein wurde „aryl hydrocarbon receptor“ (Ah Rezeptor, AhR) benannt (Poland und Knutson, 1982).

Die Verwendung des Photoaffinitätsliganden [ $^{125}$ I]-2-azido-3-iod-7,8-dibromdibenzo-*p*-dioxin zur Markierung und Isolierung des Ah Rezeptors durch Gelelektrophorese (Bradfield et al., 1988; Perdew und Poland, 1988) führte zur Aufklärung einer partiellen Aminosäuresequenz des Ah Rezeptors (Bradfield et al., 1991), was im Weiteren die Klonierung der AhR cDNA ermöglichte. Die Klonierung der cDNA gelang zunächst für den Ah Rezeptor in Mäusen (Burbach et al., 1992; Ema et al., 1992), dann auch in zahlreichen weiteren Spezies wie Mensch (Dolwick et al., 1993a; Ema et al., 1994), Ratte (Carver et al., 1994), Kaninchen (Takahashi et al., 1996) und Huhn (Walker et al., 2000). Beim Menschen wurde das Gen des Ah Rezeptors auf dem Chromosom 7p15 (Micka et al., 1997) und bei der Maus auf dem Chromosom 12 (Schmidt et al., 1993) lokalisiert. Neben umfangreichen Studien zum AhR Signalweg in Säugetieren sind auch Existenz und Charakteristik des Ah Rezeptors in anderen Wirbeltieren wie Vögeln (Sanderson und Bellward, 1995) und Fischen (Hahn et al., 1994; Hahn, 2001) beschrieben worden. Die Klonierung des Ah Rezeptors sowie zahlreiche Deletions- und Mutageneseexperimente führten zur Identifizierung funktioneller Merkmale des Ah Rezeptors, wie auch seines Dimerisationspartners, dem Protein Arnt, die in der Domänenstruktur reflektiert werden (Abb. 1).

Der Ah Rezeptor ist ein induzierbarer liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor, der zur bHLH/PAS-Superfamilie der Transkriptionsfaktoren gehört (Ema et al., 1992; Burbach et al., 1992). Die Einteilung der Transkriptionsfaktoren basiert auf strukturellen Ähnlichkeiten in ihren Bindungsdomänen. So ist eine basische Region gefolgt von einem Helix-Schleife-Helix-Motiv (basic helix-loop-helix, bHLH) ein gängiges Strukturmotiv, das im Falle des Ah Rezeptors für die Dimerisation mit dem Partnerprotein Arnt, für die DNA-Bindung und für die Interaktion mit Hitzeschockproteinen notwendig ist (Fukunaga et al., 1995; Dolwick, 1993b) (Abb. 1). Eine Untergruppe der bHLH-Proteinfamilie besitzt als zweites Strukturmotiv die PAS Domäne. PAS ist das Akronym der ersten drei identifizierten Proteine, die ebenfalls dieses Motiv tragen: das

*Drosophila* Protein „Period“ (Per), das menschliche „Arnt“-Protein und das *Drosophila* „Single-minded“ Protein (Sim). Die PAS Domäne des Ah Rezeptors ist unterteilt in die beiden hydrophoben Strukturelemente PAS-A und PAS-B. Das Strukturmotiv PAS-A vermittelt die Dimerisation von AhR und Arnt (Lindebro et al., 1995; Chapman-Smith et al., 2004), während PAS-B Bindungsstellen für Hitzeschockproteine (Hsp90) enthält und an der Ligandenbindung beteiligt ist (Fukunaga et al., 1995).



**Abb. 1:** Domänenstruktur des AhR (nach Denison et al., 1998a)

Andere Proteine der bHLH/PAS Familie reagieren auf externe Stimulation z. B. durch Licht oder durch niedrige Sauerstoffgehalte, wie die „Hypoxia Inducible Factors“ (HIFs), oder sind an der Regulation des Tagesrhythmus, wie die Proteine „Cycle“ und „Per“, beteiligt (Gu et al., 2000).

Als weiteres funktionelles Strukturelement enthält der Ah Rezeptor eine C-terminale glutamin-(Q)-reiche Transaktivierungsdomäne, die die Transkription kontrolliert (Kumar et al., 2001). Daneben regeln Transportsignalsequenzen die Lokalisation des Ah Rezeptors. So kontrollieren die „nuclear localization signals“ (Kernlokalisations-signale, NLS) den Export des AhR-Komplexes in den Zellkern, wohingegen die leucinreichen „nuclear export signals“ (Kernexportsignale, NES), die sich ebenfalls in der bHLH-Domäne befinden, für das Ausschleusen der Komplexe aus dem Zellkern zuständig sind (Ikuta et al., 1998).

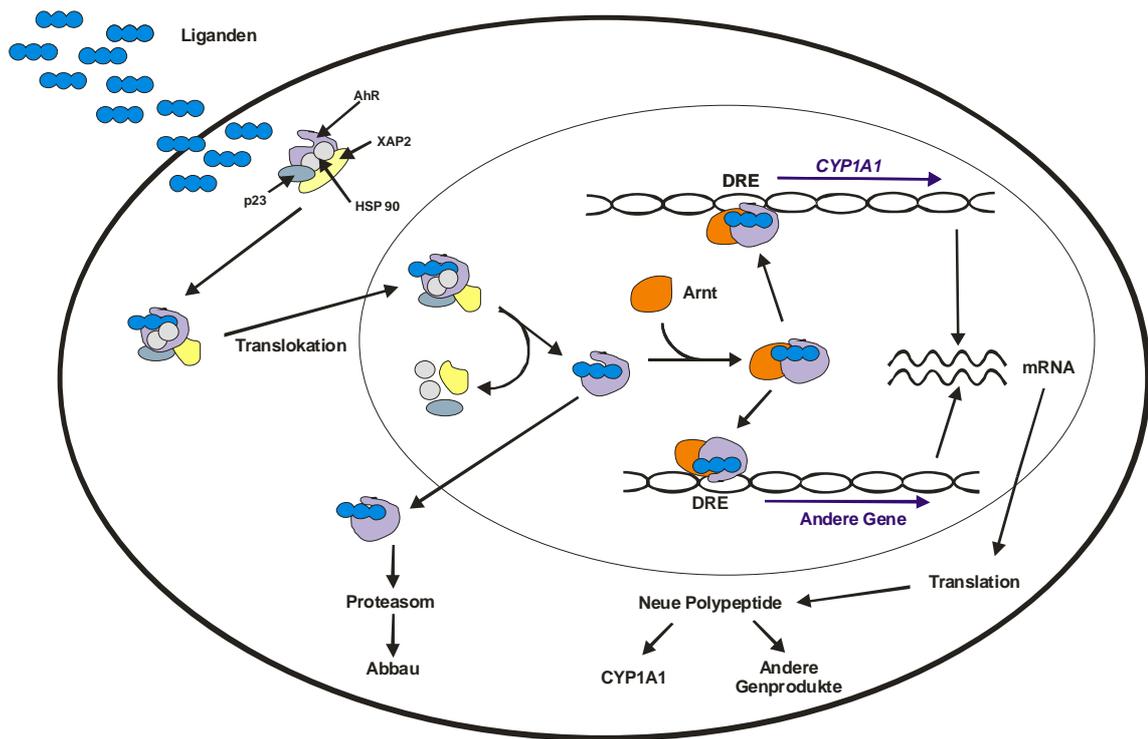
## 1.2 Mechanismus der AhR vermittelten Genexpression

Der durch die Wechselwirkung von Ah Rezeptor und AhR Agonisten ausgelöste molekulare Mechanismus der AhR vermittelten Genexpression ist ein mehrstufiger Prozess, der insbesondere für die Expression von Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) charakterisiert wurde.

Abbildung 2 zeigt die Schlüsselschritte der AhR vermittelten Genexpression:

In Abwesenheit von Liganden liegt der Ah Rezeptor im Cytosol in einem Multiprotein-komplex mit zwei Molekülen Hitzeschockprotein 90 (hsp90) (Denis et al., 1988; Perdew, 1988), dem immunophilin-ähnlichen X-assoziierten Protein 2 (XAP2) (Ma und Whitlock, 1997; Carver und Bradfield, 1997; Meyer et al., 1998) und dem Co-Chaperon p23 (Kazlauskas et al., 1999) vor.

Die Hitzeschockproteine interagieren mit dem Ah Rezeptor sowohl in der bHLH Region als auch in der Ligandenbindungsdomäne der PAS-B Region (Antonsson et al., 1995; Whitelaw et al., 1993b) und üben im AhR Protein mehrere Funktionen aus: Die im Bereich der bHLH-Domäne gebundenen hsp90 sind vorwiegend daran beteiligt, den ligandfreien AhR Komplex im cytosolischen Kompartiment zu halten, indem sie die „nuclear localization signals“ (NLS) (Kazlauskas et al., 2001), die DNA-Bindungs- und die Dimerisationsdomäne (Whitelaw et al., 1993b) des Ah Rezeptors maskieren (Phelan et al., 1998a). Durch Überlappung der hsp90 bindenden Regionen mit der Ligandenbindungsdomäne haben die hsp90 Chaperone entscheidenden Einfluss bei der Ausbildung der korrekten Proteinfaltung und sind notwendig, um den AhR in seiner hoch-affinen Ligandenbindungsform zu stabilisieren (Pongratz et al., 1992; Whitelaw et al., 1995). Eine absolute Notwendigkeit der hsp90 zur Aufrechterhaltung der Ligandenbindung konnte jedoch nur bei einigen Spezies gezeigt werden (Phelan et al., 1998a). Die hsp90 Proteine werden durch Interaktion mit dem p23 Co-Chaperon stabilisiert (Kazlauskas et al., 1999). Das XAP2 Protein, auch AIP (AhR Interacting Protein) bzw. ARA9 (AhR Associated Protein 9) genannt, stabilisiert den Rezeptor im Cytoplasma und schützt ihn vor Ubiquitinierung und anschließendem Abbau durch das Proteasom (Kazlauskas et al., 2000; Petrusis et al., 2000; Lees et al., 2003).



**Abb. 2:** Molekularer Mechanismus der AhR vermittelten Genexpression (nach Denison und Nagy, 2003)

Die ins Cytosol responsiver Zellen eingedrungenen lipophilen exogenen Liganden binden an die dort vorliegenden AhR Komplexe. Die Bindung eines Liganden führt zu einer Konformationsänderung des Ah Rezeptors, in dessen Folge die Signale für die Kernlokalisierung (NLS) exponiert werden (Kazlauskas et al., 2001) und sich die Translokation des AhR-Ligand-Komplexes in den Zellkern anschließt (Hord und Perdew, 1994; Pollenz et al., 1994). Im Zellkern dissoziiert der AhR-Ligand-Komplex aus dem Multiproteinkomplex und erhält seine hoch-affine DNA-Bindungsform, indem er mit dem Arnt (Ah receptor nuclear translocator), einem verwandten nukleären bHLH-PAS Protein, dimerisiert (Probst et al., 1993).

Der AhR-Ligand-Arnt-Komplex wirkt als ein transkriptionaler Aktivator, der an spezifische DNA-Erkennungssequenzen („dioxin responsive elements“, DRE; auch „xenobiotic response elements“, XRE genannt) bindet (Harper et al., 1992; Whitelaw et al., 1993a; Bank et al., 1995). Die DREs besitzen die Kernsequenz 5'-GCGTG-3' (Sun et al., 2004; Swanson et al., 1995; Yao und Denison, 1992) und befinden sich in der Enhancer-Region des CYP1A1 Gens und anderer responsiver Gene. Die Bindung des

AhR-Ligand-Arnt-Komplexes führt durch Veränderung der Chromatinstruktur zu einer verbesserten Promotorzugänglichkeit (Ko et al., 1996; Morgan und Whitlock, 1992), zur Aktivierung des Promotors und zur Transkription benachbarter Gene. Darunter befinden sich Gene, die für die Metabolismusenzymer Cytochrom P450 (CYP) 1A1, 1A2 und 1B1, Glutathion-S-Transferase Ya und UDP-Glucuronyl-Transferase kodieren (vgl. Abschnitt B 3.2).

Im Anschluss an die Gentranskription unterliegt der AhR-Arnt-Komplex der Ausschleusung aus dem Zellkern ins Cytosol und dortigen Abbauvorgängen (Davarinos und Pollenz, 1999; Pollenz und Barbour, 2000). Die Ausschleusung des AhR Proteins wird über die Kernexportsignale (NES) in der zweiten Helix der bHLH-Region (Ikuta et al., 1998) reguliert. Daneben wurde eine zweite NES identifiziert, die sich im N-terminalen Bereich der PAS-Domäne befindet und die ebenfalls an diesem Prozess beteiligt sein könnte (Berg und Pongratz, 2001).

Der eigentliche Abbau des AhR Komplexes wird durch Ubiquitin vermittelt und erfolgt durch das 26 S Proteasom im Cytosol (Ma und Baldwin, 2000; Davarinos und Pollenz, 1999). Der nukleäre Export und proteasome Abbau im Cytosol gelten als Regulationsmechanismus zur Kontrolle der Aktivität des Ah Rezeptors, da über die Abbaurate die Konzentration an AhR-Arnt-Komplexen im Zellkern, die mit der DNA assoziiert sind, moduliert wird und somit auch Dauer und Stärke der Genexpression bestimmt wird (Davarinos und Pollenz, 1999) (vgl. auch Abschnitt B 1.3).

## 1.3 Modulation der zellulären AhR Gehalte

### 1.3.1 Der ligand-aktivierte AhR Abbau

Der proteolytische Abbau des ligand-aktivierten Ah Rezeptors ist wesentlich für die Regulierung des AhR Signalwegs und der zellulären AhR Gehalte: Der Abbau des Ah Rezeptors wird durch die Ligandenbindung initiiert (Giannone et al., 1998; Pollenz, 1996) und verläuft sehr rasch. So beträgt die Halbwertszeit der Ah Rezeptoren in der Zelle in Abwesenheit von Liganden etwa 28 Stunden und in Anwesenheit von Liganden etwa drei Stunden (Ma und Baldwin, 2000).

Bei Inkubation von kultivierten Mausleberzellen mit 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) sind bereits 30 bis 60 Minuten nach Expositionsbeginn die AhR-Ligand-Komplexe in den Zellkernextrakten nachweisbar sowie ein signifikant geringerer AhR Gehalt im Cytosol feststellbar (Pollenz, 1996; Gianonne et al., 1995). Bei relativ hohen Dosen von TCDD folgt der Aufnahme in den Zellkern eine schnelle Abnahme der AhR Komplexe, die zur annähernd vollständigen Depletion (Erschöpfung) der nukleären Ah Rezeptoren nach 4- bis 6-stündiger Exposition führt (Giannone et al., 1995). Diese Erschöpfung der AhR Gehalte im Zellkern hält im Zellkultursystem bis zu 72 Stunden an, bevor die AhR Gehalte wieder annähernd das ursprüngliche Niveau erreichen (Giannone et al., 1998). Analoge Beobachtungen wurden auch *in vivo* bei Ratten gemacht. Dort rief die Gabe von TCDD ebenfalls eine rasche Depletion der AhR Gehalte in Lunge, Thymus, Leber und Milz hervor (Roman et al., 1998), die sich innerhalb von 10 bis 14 Tagen wieder erholten (Franc et al., 2001a; Pollenz et al., 1998).

Die Erschöpfung der Gehalte an Ah Rezeptoren sind als Folge des Abbaus der Rezeptoren über den Ubiquitin-Proteasom-Weg zu sehen. Der agonist-abhängige Abbau der Ah Rezeptoren gilt als ein (Auto-)Regulationsmechanismus um die rezeptor-vermittelte Genexpression abzuschwächen. Da die Inhibierung des AhR Abbaus zu einer signifikanten Steigerung von Dauer und Stärke der Genexpression führt (Davarinos und Pollenz, 1999), ermöglicht es der Abbau der AhR-Arnt-Ligand-Komplexe die zellulären Antworten abzuschwächen und die Zellen vor den Konse-

quenzen einer zu langen Exposition gegenüber hohen Konzentrationen an Agonisten zu schützen (Gu et al., 2000).

Im Gegensatz dazu wurde bei Studien mit persistenter Exposition gegenüber niedrigen TCDD-Gehalten *in vivo* ein anderes Regulationsmuster festgestellt. Da die Gehalte an cytosolischer AhR mRNA und an AhR Protein, ohne eine initiale Erschöpfung des AhR Rezeptors, relativ unverändert blieben bzw. anstiegen (Franc et al., 2001b), wird bei der persistenten TCDD Exposition die Ausbildung eines Gleichgewichts zwischen AhR Degradation und AhR Synthese angenommen, sodass die AhR Gehalte über einen längeren Zeitraum relativ unverändert bleiben (Franc et al., 2001b).

### **1.3.2 Das AhR Repressor Protein (AhRR)**

Vor einigen Jahren gelang die Identifizierung und Klonierung eines Proteins, das ebenfalls zur Familie der bHLH/PAS-Proteine gehört und als AhR Repressor (AhRR) bezeichnet wird. Das AhR Repressor Protein zeigt eine sehr große Homologie zum AhR, insbesondere in der bHLH- und PAS-A Domäne, während die Ligandenbindungsdomäne PAS-B im AhRR fehlt. Der AhRR fungiert in zweifacher Hinsicht als ein negativer Regulator der AhR vermittelten Signaltransduktion: Der im Zellkern lokalisierte AhRR ist befähigt, ohne die Bindung von Liganden ein Heterodimer mit Arnt zu bilden und an XRE-Sequenzen zu binden, sodass er dabei direkt mit dem Ah Rezeptor konkurriert. Daneben kann der selbst nicht transkriptional aktive AhRR-Arnt-Komplex die transkriptionale Aktivität von liganden-aktivierten AhR-Arnt-Komplexen inhibieren und wirkt daher als ein transkriptionaler Repressor der AhR Funktion (Mimura et al., 1999; Baba et al., 2001). Da die Promotorregion des AhRR Gens der Maus funktionale XRE-Motive enthält, ist der AhRR über den AhR vermittelten Signaltransduktionsweg induzierbar (Mimura et al., 1999; Baba et al., 2001).

Der AhRR fungiert somit als ein negativer Regulator des Ah Rezeptors, indem der ligand-aktivierte AhR die Expression seines eigenen Inhibierungsproteins AhRR induziert, das mit dem AhR um die Bindung an Arnt und an die entsprechenden DNA-Bindungsstellen konkurriert (Mimura et al., 1999; Baba et al., 2001).

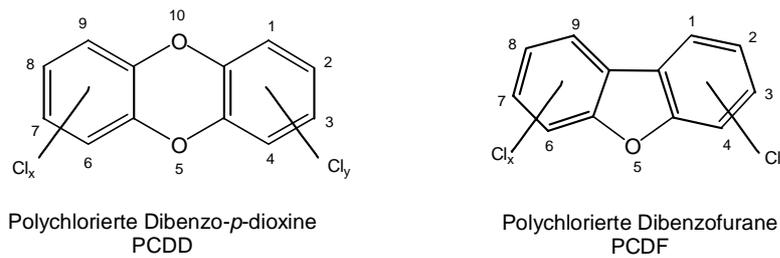
## 2 Liganden des Ah Rezeptors

Der Ah Rezeptor ist ein liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor, der die Expression einer Vielzahl von Genen in zahlreichen Spezies und Geweben reguliert (vgl. Abschnitt B 1). Die Liganden des Ah Rezeptors sind strukturell sehr unterschiedlich und lassen sich in die Kategorie der synthetischen Liganden, die als Konsequenz anthropogener und nicht-biologischer Reaktionen gebildet werden und in die Kategorie der natürlich vorkommenden Liganden, die in biologischen Systemen durch natürliche Prozesse gebildet werden, unterteilen.

### 2.1 Klassische Liganden – PAHs und HAHs

Zu den klassischen Liganden des Ah Rezeptors zählen die nicht halogenierten polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe („polycyclic aromatic hydrocarbons“, PAHs) und die halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe („halogenated aromatic hydrocarbons“, HAHs). Zur Gruppe der PAHs gehören z. B. 3-Methylcholanthren, Benzo[a]pyren, Benzanthracen und Benzoflavon (vgl. Abb. 4). Diese entstehen durch unvollständige Pyrolyse von Kohlenstoffquellen und treten typischerweise in Dieselabgasen, Zigarettenrauch und stark gegrillten Lebensmitteln auf (Koss, 2004). Zu den HAHs gehören unter anderem die polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxine (PCDDs), polychlorierten Biphenyle (PCBs) und polychlorierten Dibenzofurane (PCDFs) (Abb. 3).

Charakterisierend für die einzelnen Verbindungen ist die Anzahl der Halogenatome sowie deren Stellung zueinander. Die größte toxische Relevanz haben polychlorierte Verbindungen, jedoch werden in jüngster Zeit auch nachteilige gesundheitliche Effekte durch die bromierten Analoga diskutiert (Birnbaum et al., 2003; Brown et al., 2004). Je nach Anzahl und Position der Chloratome sind bis zu 75 verschiedene PCDDs und 135 verschiedene PCDFs denkbar. Als toxikologisch relevant werden jedoch nur sieben PCDDs und zehn PCDFs angesehen. Gemeinsames Kriterium dieser toxischen Kongenere ist die Substitution in 2, 3, 7 und 8 Stellung (Ballschmiter und Bacher, 1996).



**Abb. 3:** Strukturformeln der polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxine (PCDD) und polychlorierten Dibenzofurane (PCDF)

Die halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe (HAHs) sind ubiquitär verbreitete Umweltkontaminanten, die anthropogenen Ursprungs sind. Während die polychlorierten Biphenyle (PCBs) kommerziell in Elektronikbauteilen, wie Transformatoren und Kondensatoren, sowie als Kühlmittel und Weichmacher in Plastik eingesetzt wurden, haben die PCDDs und PCDFs keinen industriellen Nutzen. Sie werden nicht gezielt chemisch hergestellt, sondern entstehen als Nebenprodukte im Spurenbereich bei industriellen und thermischen Prozessen. Die Quellen für den Dioxineintrag in die Umwelt haben sich in den letzten beiden Jahrzehnten stark verändert. Während früher die chemische Industrie bei der Herstellung und Verarbeitung chlorierter organischer Verbindungen (z. B. Chlorphenole, polychlorierte Biphenyle) sowie die Papierindustrie bei der Zellstoffbleichung als Hauptquellen für die Entstehung von PCDDs und PCDFs anzusehen waren, sind heute vor allem thermische Prozesse in Anwesenheit von Chlorverbindungen von Bedeutung. So kann es z. B. in Müllverbrennungsanlagen im Temperaturbereich von ca. 300 °C unter Sauerstoffmangel zur Bildung von Dioxinen kommen. Geeignete Prozessführung bei der Verbrennung und Abgasreinigung machen es mittlerweile möglich, die Emissionen von Dioxinen stark zu minimieren. Weitere Quellen für Dioxine sind die metallurgische Industrie (Erzverhüttung, Chloralkali-elektrolyse, Metallrecycling) und die Verbrennung von Holz und fossilen Brennstoffen durch Kraftwerke und Hausbrand (Fiedler, 1998; Ballschmiter und Bacher, 1996).

Die Relevanz einer möglichen Gefährdung von Umwelt und Gesundheit durch HAHs ergibt sich aus der Toxizität, der chemischen Stabilität, der Widerstandskraft gegenüber chemisch-biologischen Abbauprozessen und der hohen Lipophilie dieser Verbindungen, die zur ubiquitären Verteilung und zur Anreicherung (Bioakkumulation) von HAHs in der Umwelt und in der Nahrungskette führen.

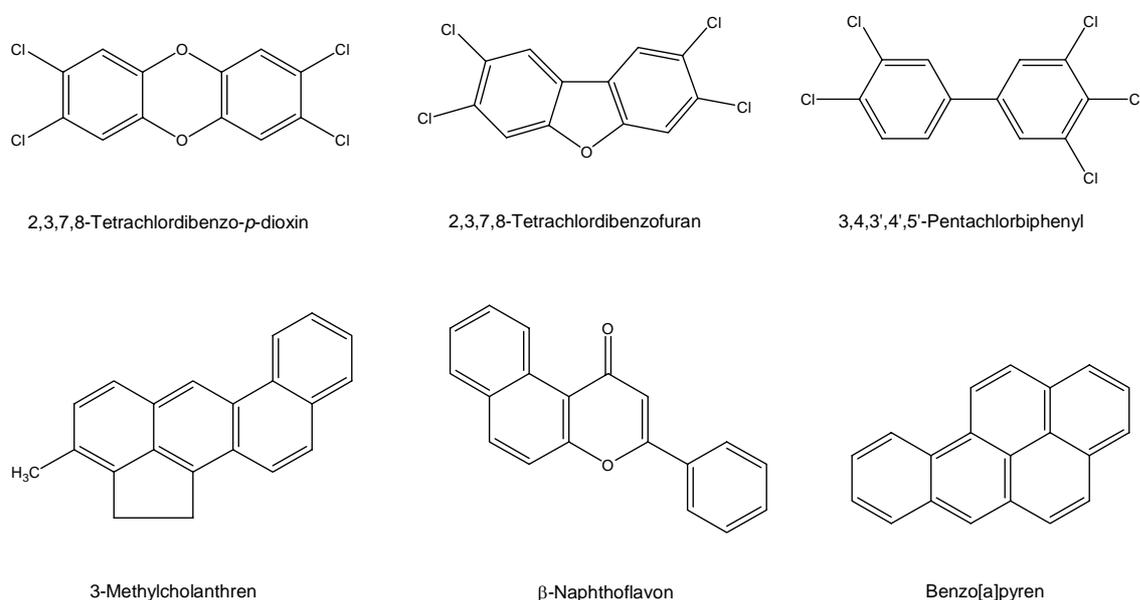
Der Abbau der HAHs in der Umwelt erfolgt vorwiegend über die Photolyse durch UV-Licht (Crosby und Wong, 1977; Atkinson, 1991). Durch die Absorption der HAHs an Luft- und Bodenpartikel wird dieser Abbau jedoch stark verzögert, sodass die Halbwertszeit von an Bodenpartikeln gebundenem 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) (vgl. Abb. 4) zwischen 10 und 12 Jahren beträgt (Kimbrough et al., 1984). Die experimentell bestimmten Halbwertszeiten von TCDD in Säugetieren variieren von 8 bis 24 Tagen bei Mäusen, 30 bis 94 Tagen bei Meerschweinchen, 15 Tagen bei Hamstern und etwa 21 Tagen bei Ratten (Miniero et al., 2001). Anhand von Untersuchungen bei Personen, die berufsbedingt oder bei Unfällen mit TCDD in Berührung kamen, wird eine biologische TCDD-Halbwertszeit von etwa sieben bis zehn Jahren beim Menschen angenommen (Miniero et al., 2001). Studien zu Metabolismus und Exkretion mit radioaktiv markierten PCDDs zeigten, dass über 90 % der Verbindungen unverändert über den Faeces ausgeschieden wurden, während das über Urin und Galle ausgeschiedene Material aus polaren Metaboliten bestand (Olson, 2003). Der metabolische Abbau von TCDD im Säugerkörper beinhaltet Reaktionen wie Hydroxylierung, Dechlorierung, Epoxidierung und Spaltung der Sauerstoffbrücke (Hu und Bunce, 1999).

Als Hauptquelle (> 90 %) der Exposition des Menschen gegenüber PCDDs und PCDFs gilt die Nahrung (Liem et al., 2000). Insbesondere betroffen sind tierische Lebensmittel wie Milch, Fleisch und Fisch, während die Aufnahme aus pflanzlichen Lebensmitteln nur eine untergeordnete Rolle spielt (Fürst, 1998; SCF, 2000).

Durch gesetzliche Regelungen, wie Anwendungsverbote, und emissionsmindernde Maßnahmen konnte die Freisetzung von TCDD und verwandten Verbindungen durch industrielle Anlagen in den letzten 15 Jahren stark reduziert werden. Aufgrund der hohen Persistenz dieser Verbindungen bleibt eine Exposition von Mensch und Umwelt jedoch weiterhin von Bedeutung (Mitteilung der EU-Kommission, 2001).

Die HAHs repräsentieren die potenteste Klasse von AhR Liganden mit einer hohen Affinität zum Ah Rezeptor. Dies zeigt sich an den Dissoziationskonstanten, die im pM bis nM (pmol/l bis nmol/l) Bereich liegen. Die gegenüber metabolischen Abbauprozessen weniger stabilen PAHs binden mit einer deutlich geringeren Affinität im nM bis  $\mu$ M Bereich an den Ah Rezeptor. Der bekannteste Vertreter der HAHs ist das

2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD, Dioxin), das der stärkste bisher bekannte AhR Ligand ist und als Prototyp aller AhR Liganden gilt. Untersuchungen zu den Struktur-Wirkungsbeziehungen mit zahlreichen HAHs und PAHs führten zum so genannten klassischen Modell der AhR Ligandenbindungsstelle. Dieses beschreibt, dass die AhR Ligandenbindungsstelle planare Liganden mit den maximalen Dimensionen 14 Å x 12 Å x 5 Å akzeptiert und dass die Bindungsaffinität der Liganden von deren elektronischen und thermodynamischen Eigenschaften abhängt (Gillner et al., 1993; Kafafi et al., 1993; Waller und McKinney, 1995).



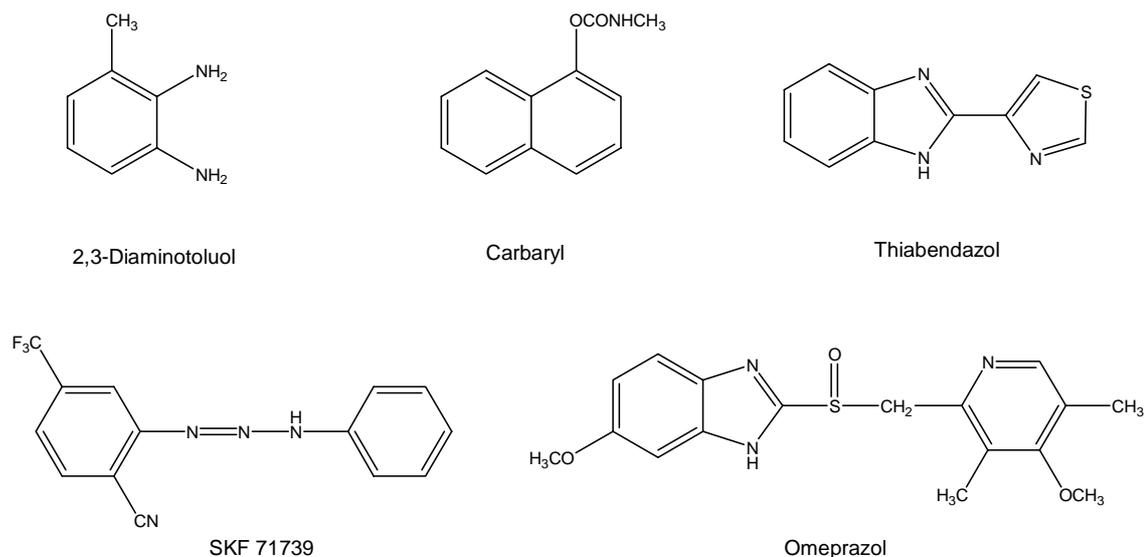
**Abb. 4:** Übersicht verschiedener klassischer AhR Liganden (nach: Denison und Nagy, 2003)

## 2.2 Nicht-klassische synthetische AhR Liganden

Neben den AhR Liganden aus der Klasse der HAHs und PAHs wurden weitere synthetisch hergestellte Verbindungen identifiziert, die fähig sind den Ah Rezeptor zu aktivieren und / oder die AhR vermittelte Genexpression zu induzieren. Zu diesen nicht-klassischen synthetischen AhR Liganden zählen verschiedene Methylendioxybenzol-, Imidazol- und Pyridinderivate (Abb. 5). Sie unterscheiden sich strukturell deutlich von der planaren, aromatischen und hydrophoben Natur der klassischen AhR Liganden und

sind mit den Anforderungen des klassischen Ligandenbindungsmodells unvereinbar (Denison und Nagy, 2003; Denison et al., 1998b).

Die meisten der nicht-klassischen synthetischen AhR Liganden sind, verglichen mit dem Prototypliganden TCDD, nur relativ schwache Induktoren von CYP1A1 und / oder Liganden mit geringerer Bindungsaffinität zum AhR. Dabei korreliert die niedrige Bindungsaffinität (mM-Bereich) mit der deutlich geringeren Fähigkeit dieser Verbindungen eine Genexpression zu induzieren (Denison et al., 1998b). Die Identifizierung dieser Kategorie von AhR Liganden zeigt, dass das klassische Modell der AhR Ligandenbindungstasche zu restriktiv ist und dass das Spektrum an Liganden wesentlich größer ist als ursprünglich aufgrund des klassischen Ligandenbindungsmodells angenommen wurde (Denison und Nagy, 2003).



**Abb. 5:** Übersicht verschiedener nicht-klassischer synthetischer AhR Liganden bzw. CYP1A1 Induktoren (Denison und Nagy, 2003; Denison et al., 1998b)

## **2.3 Natürliche Liganden des Ah Rezeptors**

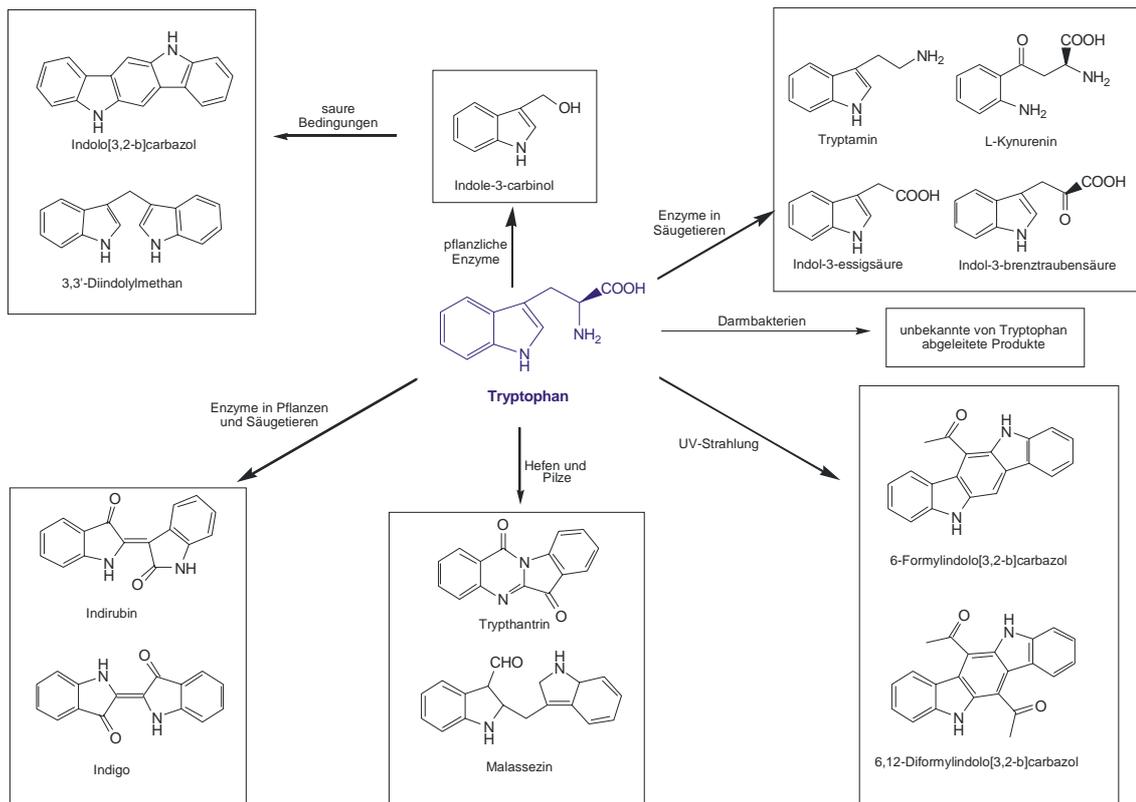
Neben den klassischen und nicht-klassischen synthetischen AhR Liganden können auch zahlreiche natürlich vorkommende Verbindungen an den Ah Rezeptor binden, ihn aktivieren und / oder die AhR-abhängige Genexpression induzieren. Innerhalb dieser Kategorie der natürlichen AhR Liganden unterscheidet man Liganden, die exogenen Ursprungs sind und vorwiegend aus der Nahrung stammen, sowie endogene *in vivo* auftretende Liganden. Beide Gruppen von natürlichen AhR Liganden lassen sich nicht immer klar abgrenzen, sodass es auch zu Überlappungen, wie bei der Gruppe der indolhaltigen Verbindungen, kommt.

### **2.3.1 Natürliche aus der Nahrung stammende AhR Liganden**

Der größte Teil der AhR Liganden, mit denen Menschen in Kontakt kommen, stammt aus der Nahrung. Dies schließt nicht nur die Aufnahme von Umweltkontaminanten wie TCDD, sondern auch die Aufnahme von natürlichen AhR Liganden ein. Die Mehrzahl der bisher identifizierten natürlichen AhR Liganden stammt direkt aus der Nahrung oder aus pflanzlichen Produkten, die der Ernährung dienen (Denison et al., 2002). Zu den natürlicherweise in der Nahrung vorkommenden Gruppen von AhR Liganden gehören Flavonoide, Carotinoide und Indole, deren verschiedene Vertreter den AhR Signalweg entweder aktivieren bzw. inhibieren können und die in der Regel relativ schwache AhR Liganden darstellen. Da diese Verbindungen schnell metabolisiert und ausgeschieden werden, sind sie, im Vergleich zu den HAHs, als wenig(er) gesundheitsschädlich einzustufen, stellen jedoch eine wichtige Quelle von „dioxin-ähnlichen“ Verbindungen dar, denen der Mensch ausgesetzt ist.

#### **2.3.1.1 Indole und indolhaltige Verbindungen**

Zu den am besten charakterisierten natürlichen AhR Liganden gehören von Indol abgeleitete Verbindungen. Abbildung 6 gibt einen Überblick über verschiedene biologische und physiochemische Prozesse, die zur Bildung von AhR Liganden aus Tryptophan führen.



**Abb. 6:** Übersicht möglicher Umwandlungen von Tryptophan zu AhR Liganden und Induktoren der AhR-abhängigen Genexpression (nach Denison und Nagy, 2003)

Es konnte gezeigt werden, dass aus der Nahrung stammende Indole, wie die Aminosäure Tryptophan und das durch enzymatische Hydrolyse aus Glucobrassin (3-Indolyl-glucosinolat) freigesetzte Indol-3-carbinol (I3C), in der Lage sind den Ah Rezeptor zu aktivieren und die AhR vermittelte Genexpression zu induzieren (Heath-Pagliuso et al., 1998; Heath-Pagliuso et al., 2000; Bjeldanes et al. 1991; Jellnick et al., 1993). Diese Verbindungen sind nur relativ schwache Liganden des Ah Rezeptors. Jedoch kommt es nach oraler Aufnahme von I3C im sauren Milieu des Magens zur Bildung mehrerer Kondensationsprodukte, wie Indolo-[3,2-b]-carbazol (ICZ) und 3,3'-Diindolylmethan (DIM) (Grose und Bjeldanes, 1992) (Abb. 6), die ebenfalls den AhR aktivieren und die AhR vermittelte Genexpression induzieren können. Im Gegensatz zum Vorläufer I3C sind diese Verbindungen relativ starke AhR Liganden. Insbesondere ICZ zeigt eine sehr hohe Affinität zum AhR, die bei *in vitro*

Bindungsassays in der Größenordnung von TCDD liegt (Bjeldanes et al., 1991; Gillner et al., 1993) und eine der höchsten Bindungsaffinitäten von natürlich vorkommenden AhR Liganden darstellt (Tab. 1).

**Tab. 1:** Bindungsaffinitäten von indolhaltigen Verbindungen im Vergleich zu TCDD (nach Bjeldanes et al., 1991),  $K_d$ : Dissoziationskonstante

Verbindung	$K_d$ [M]	Relative Bindungsaffinität
TCDD	$7,1 \times 10^{-12}$	1
ICZ	$1,9 \times 10^{-10}$	$3,7 \times 10^{-2}$
DIM	$9,0 \times 10^{-8}$	$7,8 \times 10^{-5}$
I3C	$2,7 \times 10^{-5}$	$2,6 \times 10^{-7}$

Mittels DRE-abhängiger Reporterassays in humanen HepG2-Zellen (Kleman et al., 1994) und in Hepal-Zellen der Maus (Chen et al., 1995) konnte außerdem nachgewiesen werden, dass ICZ und TCDD ungefähr gleiche Wirkstärken besitzen. Im Gegensatz zu dieser starken agonistischen Aktivität in Zellkultursystemen zeigten Versuche zur Toxizität von ICZ an TCDD-empfindlichen Ratten, dass ICZ keine toxischen Effekte vergleichbar denen von TCDD auslösen konnte (Pohjanvirta et al., 2002). Die Unterschiede zwischen der Wirksamkeit von ICZ in Zellkultursystemen und *in vivo* erklärt sich aus der relativ kurzen Halbwertszeit von ICZ *in vivo*. Im Gegensatz zu TCDD wird ICZ im Rattenmodell schnell metabolisiert und eliminiert, sodass ICZ keine ausreichenden Konzentrationen im Zielorgan aufbauen kann, um eine Schädigung des Organismus hervorzurufen (Pohjanvirta et al., 2002; Bjeldanes et al., 1991).

Als weitere natürliche AhR Liganden wurden verschiedene Rutacarpin-Alkaloide identifiziert, die in Pflanzen aus der Familie der Rutaceae (Citrus, Orange, Mandarine) vorkommen. Insbesondere 7,8-Dihydrorutacarpin stellt einen weiteren hoch-affinen AhR Liganden dar (Gillner et al., 1989).

Schrenk und Mitarbeiter zeigten weiterhin, dass auch Tryptanthrin-Derivate als Agonisten des Ah Rezeptors wirken können. Tryptanthrine werden durch die Hefe *Candida lipolytica*, die auch in menschlicher Nahrung auftritt, aus Tryptophan und Anthranilsäure biosynthetisiert. So ist zum Beispiel 8-Methyltryptanthrin in der Lage

CYP1A1 in Rattenhepatozyten zu induzieren und die Transformation des AhR-Ligand-Rezeptorkomplexes in Mausleberzellen zu stimulieren (Schrenk et al., 1997 und 1999).

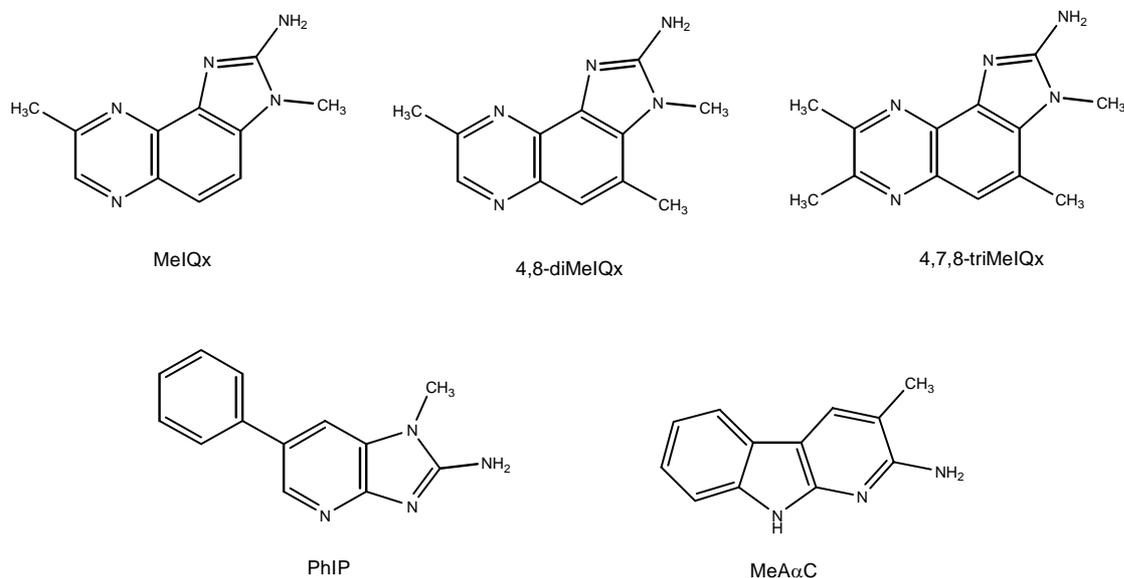
Neben den Tryptanthrinen wird auch Malassezin als weiterer mikrobieller Tryptophan-Metabolit und AhR Agonist diskutiert. Malassezin ist ein Tryptophanabbauprodukt der Hefe *Malassezia furfur*, die Teil der menschlichen Hautflora ist. Malassezin induziert in Rattenhepatozyten die CYP1A1 abhängige 7-Ethoxyresorufin-O-dealkylase (EROD). Allerdings könnte diese Reaktion auch auf eine schnelle Zyklisierung von Malassezin zu Indolo-[3,2-b]-carbazol zurückzuführen sein (Wille et al., 2001).

### 2.3.1.2 Carotinoide

Aus der Klasse der Carotinoide wurden bisher die beiden 4-Oxocarotinoide, Canthaxanthin und Astaxanthin sowie die Carotinoidvorstufe  $\beta$ -Apo-8'-carotenal *in vivo* als starke Induktoren von CYP1A1 identifiziert, wohingegen  $\beta$ -Carotin selbst nicht aktiv ist (Gradelet et al., 1996a; Gradelet et al., 1996b, Astorg, et al., 1994). Da in Ligandenbindungsstudien keine direkte Bindung dieser Carotinoide an den Ah Rezeptor nachweisbar war und sich Größe und Struktur der Moleküle deutlich von allen bisher identifizierten Liganden unterschieden, wird angenommen, dass die Verbindungen in den Zellen metabolisiert werden und die Metabolismusprodukte für die beobachtete Induktion verantwortlich sind (Denison et al., 1998b; Gradelet et al., 1997). Die Carotinoide und die Retinoide, als ihre Abbauprodukte im Körper, zählen nicht nur zur Klasse der von Pflanzen abgeleiteten AhR Liganden, sondern sind auch unter dem Aspekt der endogenen AhR Liganden zu sehen und werden deshalb unter „natürliche endogene Liganden“ im Abschnitt B 2.3.2.4 diskutiert.

### 2.3.1.3 Heterozyklische Amine

Heterozyklische aromatische Amine kommen im strengen Sinne nicht natürlich vor, werden jedoch bei der Zubereitung (Kochen, Braten, Grillen) eiweißhaltiger Lebensmittel, vor allem von Fleisch und Fisch, im ppb-Bereich gebildet (Felton et al., 2000). Die IARC (International Agency for Research on Cancer) stuft acht der bisher bekannten heterozyklischen Amine, nämlich MeIQ, MeIQx, PhIP, A $\alpha$ C, MeA $\alpha$ C, Trp-P-1, Trp-P-2 und Glu-P-1, als „possible human carcinogen“ (Klasse 2B) und IQ als „probable human carcinogen“ (Klasse 2A) ein (IARC, 1993).



**Abb. 7:** Strukturformeln der heterozyklischen Amine mit AhR Ligandenaktivität

Die Kanzerogenität der heterozyklischen aromatischen Amine beruht auf der metabolischen Aktivierung dieser Verbindungen, deren initialer Schritt eine durch Cytochrome vermittelte *N*-Oxidation ist. Während diese metabolische Aktivierung in der Leber fast ausschließlich durch CYP1A2 vermittelt wird, erfolgt sie in extrahepatischen Geweben vorwiegend durch CYP1A1 und CYP1B1 (Gooderham et al., 2001).

Kleman und Mitarbeiter (1992) konnten mittels *in vitro* Gelretardation Assays (vergl. Abschnitt B 4.2) die Aktivierung des Ah Rezeptors durch fünf verschiedene heterozyklische Amine zeigen. In einem zytosolischen Extrakt von Mausleberzellen induzierten die heterozyklischen Amine MeA $\alpha$ C, MeIQx, PhIP, 4,8-DiMeIQ und 4,7,8-

TriMeIQx (Abb. 7) die Transformation des Ah Rezeptors und die Bindung des AhR-Ligand-Komplexes an die DNA. Die aus den Dosis-Wirkungsbeziehungen ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte für die Bildung der Protein-DNA-Komplexe lagen dabei im Bereich von 30 bis 135 µM (Kleman et al., 1992). Gleichzeitig konnte auch gezeigt werden, dass die heterozyklischen aromatischen Amine fähig sind, CYP1A-Aktivitäten zu induzieren (Kleman und Gustafsson, 1996; Hümmerich et al., 2004). Die getesteten heterozyklischen Amine sind demnach, verglichen mit TCDD und anderen klassischen AhR Aktivatoren, relativ schwache AhR Liganden und gelten als weitere Gruppe natürlicher AhR Liganden (Denison et al., 1998b).

#### **2.3.1.4 Flavonoide**

Die in pflanzlichen Lebensmitteln wie Gemüse, Früchten und Tees weitverbreiteten Flavonoide stellen als Bestandteile der menschlichen Nahrung eine weitere Gruppe der natürlichen AhR Liganden dar. Seit längerem ist bereits das agonistische und antagonistische Potential zahlreicher synthetischer Flavone als AhR Liganden bekannt (Lu et al., 1996; Gasiewicz et al., 1996; Henry et al., 1999). So stellt β-Naphthoflavon (BNF) (vgl. Abb. 4) einen sehr starken AhR Agonisten und sein Isomer α-Naphthoflavon (ANF) einen partiellen AhR Antagonisten dar (Gasiewicz und Rucci, 1991; Santostefano et al., 1993; Merchant und Safe, 1995), während 3'-Methoxy-4'-nitroflavon ein starkes antagonistisches Potential aufweist (Lu et al., 1995; Nazarenko et al., 2001).

Daneben konnten auch spezifische natürliche Flavonoide wie z. B. Diosmin, Tangeritin und Tamarixetin identifiziert werden, die Agonisten des Ah Rezeptors sind und den AhR Signaltransduktionsweg aktivieren (Ciolino et al., 1998; Ashida et al., 2000; Canivenc-Lavier et al., 1996; Allen et al., 2001; Amakura et al., 2003). Andere Flavonoide wie Kämpferol, Galangin, Naringenin und Luteolin üben eine antagonistische Aktivität aus und unterdrücken die AhR-abhängige Genexpression (Ciolino et al., 1999; Ashida et al., 2000; Ashida, 2000; Allen et al., 2001; Zhang et al., 2003). Anhand dieser Studien wurden innerhalb der Gruppe der Flavonoide besonders viele Liganden identifiziert, die antagonistisch wirksam sind.

### **2.3.1.5 Pflanzliche Extrakte**

Ausgehend von den Ergebnissen der Studien zu einzelnen Flavonoiden und anderen natürlich vorkommenden Liganden des Ah Rezeptors wurden auch die Extrakte verschiedener Gemüse, Früchte, Kräuter und Tees untersucht (Bohonowych et al., 2000; Amakura et al., 2002; Jeuken et al., 2003; Palermo et al., 2003). Anhand von DNA-Bindungsstudien und DRE-abhängigen Reporterassays konnte nachgewiesen werden, dass eine Vielzahl dieser Extrakte AhR Liganden mit agonistischer und / oder antagonistischer Aktivität enthalten. So sind beispielsweise die Extrakte von Ginseng, Lakritz und *Gingo biloba* in der Lage, die Bindung des AhR Komplexes an die DNA zu stimulieren und die Reporterexpression zu induzieren. Die Untersuchung der Extrakte von Mais, Kartoffeln und Paprika lieferte Hinweise, dass dort neben Agonisten auch AhR Liganden vorliegen, die zwar an den Ah Rezeptor binden, jedoch die AhR-abhängige Reporterexpression nicht induzieren und somit antagonistisch wirksam sind (Jeuken et al., 2003). Pflanzliches Material scheint somit im allgemeinen AhR Liganden bzw. Substanzen, die leicht in AhR Liganden umgewandelt werden, zu enthalten und stellt daher die wichtigste Quelle für natürlich vorkommende AhR Liganden dar, denen Mensch und Tier dauerhaft ausgesetzt sind (Denison und Nagy, 2003).

### **2.3.2 Endogene Liganden**

Außer den exogenen vorwiegend aus der Nahrung stammenden Verbindungen beinhaltet die Klasse der natürlichen AhR Liganden auch Verbindungen, die *in vivo* gebildet werden und somit endogenen Ursprungs sind. Die Existenz von endogenen, bei physiologischen Konzentrationen aktiven Liganden für den Ah Rezeptor wird aufgrund von Studien angenommen, bei denen der AhR Signalweg in Abwesenheit von exogenen Liganden aktiviert wurde (Sadek und Allen-Hoffmann, 1994; Singh et al., 1996; Monk et al., 2001). Auch die bei AhR Knockout-Mäusen auftretenden physiologischen Veränderungen und Entwicklungsschäden weisen auf die Existenz von endogenen AhR Liganden hin (Fernandez-Salguero et al., 1995; Lahvis et al., 2000; Schmidt et al., 1996), da durch das „Ausschalten“ der Ah Rezeptoren auch keine Aktivierung des AhR Signaltransduktionswegs durch endogene Liganden erfolgen kann. Für zahlreiche

endogene Verbindungen aus den Klassen der Indole, Tetrapyrrole, Arachidonsäuremetabolite, Carotinoide und Oxysterole wurde nachgewiesen, dass diese an den Ah Rezeptor binden und / oder die AhR-abhängige Genexpression induzieren. Jedoch konnte bisher kein hoch-affiner endogener Ligand identifiziert werden, der den Ah Rezeptor bei normalen physiologischen Konzentrationen aktiviert.

### 2.3.2.1 Indole

Neben den aus der Nahrung stammenden indolhaltigen Verbindungen, die den AhR aktivieren, wurden weitere endogene Indole als AhR Liganden identifiziert. So zeigte sich, dass durch UV-Bestrahlung der im nahen UV-Bereich absorbierenden Aminosäure Tryptophan verschiedene Photooxidationsprodukte entstehen, die mit hoher Affinität an den Ah Rezeptor binden und die AhR-abhängige Genexpression induzieren (Rannug et al., 1987; Helferich und Denison, 1991; Sindhu et al., 1996; Wei et al., 1999). Zwei dieser hoch-affinen Photooxidationsprodukte wurden als 6-Formyl-indolo-[3,2-b]-carbazol (FICZ) und 6,12-Diformylindolo-[3,2-b]-carbazol identifiziert (Rannug et al., 1995) und zeigen eine große strukturelle Ähnlichkeit zu ICZ (vgl. Abb. 6). Da die UV-Bestrahlung von Ratten zu einer Induktion von CYP1A1 in Haut und Leber der Tiere führt (Mukhtar et al., 1986; Goerz et al., 1996) und auch in der menschlichen Haut nach UV-Bestrahlung erhöhte CYP1A1 und CYP1B1 Aktivitäten auftreten (Katiyar et al., 2000) wird angenommen, dass diese oder ähnliche Photooxidationsprodukte auch für die CYP1A1 Induktion *in vivo* verantwortlich sein könnten (Denison und Nagy, 2003).

Weitere Studien zeigen, dass die Aminosäure Tryptophan und verschiedene Tryptophan-Metabolite wie Tryptamine und Indolessigsäure (vgl. Abb. 6) ebenfalls an den AhR binden, ihn aktivieren und die AhR-abhängige Genexpression in Hefe- und in Säugetierzellkulturen induzieren können (Miller, 1997; Heath-Pagliuso et al., 1998). Auch die Tryptophan-Abbauprodukte L-Kynurenin und Kynurensäure sowie Indol-3-brenztraubensäure und Indol-3-milchsäure wurden als Aktivatoren der AhR-abhängigen Signaltransduktion identifiziert (Heath-Pagliuso et al., 2000). Diese Tryptophan-Metabolite sind als AhR Liganden besonders bemerkenswert, weil sie zu den wenigen beschriebenen gut wasserlöslichen AhR Liganden gehören. Da diese Verbindungen relativ schwache Liganden sind und in den Zellen nur in geringen Konzentrationen

gefunden werden, ist es nicht sehr wahrscheinlich, dass diese Verbindungen unter physiologischen Bedingungen als endogene Aktivatoren wirken. Jedoch können die Konzentrationen von einigen Tryptophan-Metaboliten unter bestimmten (pathologischen) Umständen im Körper deutlich erhöht sein. So treten bei Inhibierung der Monoaminoxidase-Aktivität für Tryptamin Gewebekonzentrationen bis ca. 700  $\mu\text{M}$  auf, die ausreichend wären, um den AhR zu aktivieren (Health-Pagliuso et al., 1998).

Die aus humanem Urin isolierten Verbindungen Indirubin und Indigo (vgl. Abb. 6) sind zwei weitere Repräsentanten von endogenen indolhaltigen AhR Liganden. In einem auf Hefezellen basierenden Bioassay erwiesen sich beide Verbindungen als Aktivatoren des Ah Rezeptors, wobei Indigo annähernd gleich stark und Indirubin bis zu 50fach stärker als TCDD waren (Adachi et al., 2001; Sugihara et al., 2004). In Säugerzellen zeigten sich Indirubin und Indigo jedoch als deutlich schwächere AhR Aktivatoren als TCDD (ca.  $5 \times 10^4$ - bis  $10^5$ -fach schwächer) (Denison und Nagy, 2003; Guengerich et al., 2004). Diese signifikanten Unterschiede der biologischen Potenz von Indigo und Indirubin werden auf Unterschiede in der metabolischen Stabilität dieser Verbindungen in Säuger- und Hefezellen und auf technische Schwierigkeiten, die relative Aktivität von TCDD in auf Hefezellen basierenden Bioassays exakt zu messen, zurückgeführt (Miller et al., 1999, Denison und Nagy, 2003, Sugihara et al., 2004). Indigo und Indirubin stammen zwar vorwiegend aus pflanzlichen Quellen, da sie jedoch auch beim P450-abhängigen Metabolismus von Indolen entstehen (Gillam et al., 1999 und 2000) und im Urin von Patienten mit Leukämie und Porphyria cutanea tarda (chronische hepatische Porphyrie) (Blanz et al., 1989; Jackson et al., 1988) nachgewiesen wurden, ist die Einordnung als endogene, *in vivo* gebildete AhR Liganden gerechtfertigt (Denison und Nagy, 2003).

### **2.3.2.2 Tetrapyrrole**

Erste Hinweise einer Wechselwirkung zwischen dem AhR Signaltransduktionsweg und den Abbauwegen von endogenem Häm ergaben sich aus Tierversuchen mit TCDD. Die Exposition von TCDD führte zu Störungen der Hämbiosynthese, verbunden mit Leberschädigungen und ausgeprägter Porphyrinurie und zu einer CYP1A1 Aktivierung (Van Birgelen et al., 1996). Die persistente Induktion von CYP1A1 trat auch bei Gunn-

Ratten, die eine angeborene Gelbsucht zeigen und bei Menschen mit dem Crigler-Najjar-Syndrom auf. In beiden Fällen führt ein Mangel an UDP-Glucuronyltransferase, dem Hauptdetoxifizierungsenzym für das Häm-Abbauprodukt Bilirubin, zur Akkumulation von Bilirubin im Blut (Hyperbilirubinämie). Das Auftreten stark erhöhter CYP1A1 Aktivität bei diesen speziellen pathogenen Bedingungen ließ auf das Vorhandensein eines endogenen AhR Liganden im Blut der Tiere schließen (Kapitulnik und Gonzalez, 1993).

Zellkulturexperimente zeigten, dass das im Blut von Gunn-Ratten in hohen Konzentrationen auftretende Bilirubin (Abb. 8) und sein metabolischer Vorläufer Biliverdin die Expression von CYP1A1 und von AhR-abhängigen Reportergenen induzieren können (Sinal und Bend, 1997). Mittels eines kompetitiven Ligandenbindungsassays konnte außerdem nachgewiesen werden, dass beide Verbindungen in der Lage sind [<sup>3</sup>H]-TCDD aus der Rezeptorbindung zu verdrängen (Phelan et al., 1998b). Die beiden Häm-Abbauprodukte Bilirubin und Biliverdin sind somit als, wenn auch relativ schwache, AhR Liganden einzuordnen. Die physiologische Relevanz dieser Ergebnisse resultiert daraus, dass Bilirubin auch von CYP1A1 und CYP1A2 metabolisiert werden kann (Zaccaro et al., 2001; De Matteis et al., 1991). Bilirubin kann somit als AhR Ligand seinen eigenen Metabolismus stimulieren, indem es die Expression von CYP1A1 und CYP1A2 erhöht und die im Körper zirkulierenden Gehalte an Bilirubin reduziert. Die AhR-abhängige Steigerung der CYP1A1 und CYP1A2 Aktivität ist in diesem Fall als ein physiologisch relevantes Detoxifizierungssystem anzusehen, das den Körper vor endogenen toxischen Verbindungen schützt.

### **2.3.2.3 Arachidonsäure-Metabolite**

Die Suche nach endogenen Liganden führte auch zur Untersuchung von Arachidonsäure und Arachidonsäure-Metaboliten, da bekannt war, dass die Exposition gegenüber TCDD die Freisetzung von Arachidonsäure aus Membranen und Veränderungen des Arachidonsäuremetabolismus hervorruft (Lawrence und Kerkvliet, 1998). Ferner induzierte TCDD neben CYP1A1 die Prostglandin Synthase H2, die die Umwandlung von Arachidonsäure in Prostglandine katalysiert (Kraemer et al., 1996). Auch die bei Suspension von Mausleber- und Rattenepithelzellen in methylcellulosehaltigem Zell-

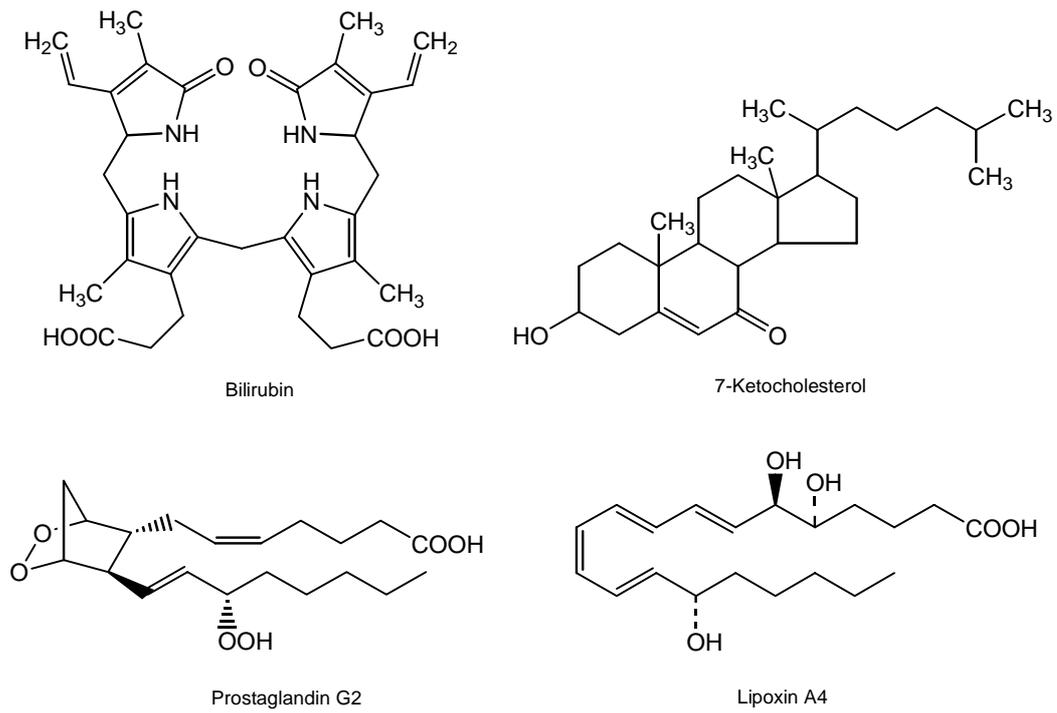
medium auftretende Induktion von CYP1A1 (Sadek und Allen-Hoffmann, 1994; Monk et al., 2001) wurde mit der Freisetzung eines endogenen Liganden aus der Zellmembran, möglicherweise aufgrund von Veränderungen der Membranstruktur, in Verbindung gebracht (Denison und Nagy, 2003). Die Untersuchung von biologischen Lipiden und Steroiden zeigte, dass das Lipoxygenaseprodukt der Arachidonsäure Lipoxin A4 (Abb. 8) sowie mehrere Prostaglandine, insbesondere das Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) (Abb. 8), in der Lage sind den AhR zu aktivieren und die AhR-abhängige Genexpression zu induzieren (Schaldach et al., 1999; Seidel et al., 2001). Lipoxin A4 führt bereits bei physiologischen Konzentrationen zu einer flüchtigen Expression von CYP1A1 und von DRE-abhängigen Reportergenen und ist gleichzeitig ein kompetitives Substrat für CYP1A1 (Schaldach et al., 1999). Im Gegensatz dazu sind die Prostaglandine, mit Ausnahme von PGG<sub>2</sub>, in Zellkulturexperimenten relativ schwache AhR Agonisten, die nur bei Konzentrationen von größer 1 µM, also oberhalb der normalen physiologischen Konzentration von weniger als 1 nM, zu einer flüchtigen AhR-abhängigen Genexpression führen (Seidel et al., 2001). Da Prostaglandine in der Regel jedoch lokal wirksame Hormone sind, können im Gewebe, vor allem in der Nähe von Hepatozyten, die Prostaglandine absondern, durchaus Konzentrationen von 5 bis 10 µM erreicht werden. Bei diesen Konzentrationen ist es möglich, dass einzelne Prostaglandine bzw. Kombinationen von Prostaglandinen den AhR *in vivo* aktivieren (Seidel et al., 2001).

#### **2.3.2.4 Sonstige endogene Liganden**

Zu den weiteren Verbindungen, die als mögliche endogene Liganden diskutiert werden, gehören die Carotinoide. Wie in Abschnitt B 2.3.1.2 dargestellt, sind mehrere Carotinoide, wie Canthaxanthin, Astaxanthin und β-Apo-8'-carotinal in der Lage CYP1A1 und andere Metabolismusenzymer zu induzieren (Gradlet et al., 1996a und 1996b; Astrong et al., 1994). Da jedoch für diese Verbindungen keine kompetitive Bindung an den Ah Rezeptor nachgewiesen werden konnte (Gradlet et al., 1997) wird angenommen, dass diese Verbindungen *in vivo* zu aktiven Liganden umgewandelt werden. *In vivo* werden aus der Nahrung stammende Carotinoide in Retinol gespalten und in andere Vitamin A Metabolite (Retinoide) umgewandelt. Die Retinoide sind

wichtige Regulatoren bei Prozessen wie Zelldifferenzierung und Zellproliferation, vor allem von Epithelzellen. Normalerweise vermitteln sie ihre biologischen Wirkungen indem sie an die Retinsäure-Rezeptoren (Retinoic acid receptor, RAR) und die Retinoid-X-Rezeptoren (Retinoid X Receptor, RXR) binden und die damit verbundenen Genexpressionen modulieren. Ein Zusammenhang zwischen AhR Signalweg und Retinoiden wurde bereits aufgrund der von TCDD ausgelösten Veränderungen in der Homöostase und des Metabolismus der Retinoide angenommen (Brouwer et al., 1989; Fletcher et al., 2001; Kelley et al., 2000). Auch die bei AhR Knockout Mäusen ermittelte Akkumulation von Retinoiden und der eingeschränkte Vitamin A-Metabolismus sind weitere Belege für die Beteiligung des Ah Rezeptors an der Regulation des Retinoid-Metabolismus (Andreola et al., 1997). In den vergangenen Jahren konnten mehrere synthetische Retinoide identifiziert werden, die an den AhR binden und die AhR-abhängige Genexpression induzieren (Gambone et al., 2002; Soprano et al., 2001). Diese Studien belegen, dass Retinoide bzw. retinoidartige Verbindungen als endogene Liganden des Ah Rezeptors in Frage kommen, wenngleich bisher nur synthetische Retinoid-Derivate als AhR Liganden identifiziert wurden (Denison und Nagy, 2003).

Die Suche nach weiteren endogenen Liganden führte auch zur Untersuchung von oxidierten lipophilen Verbindungen, wie den Oxysterolen. Dabei wurde gezeigt, dass 7-Ketocholesterol (Abb. 8) kompetitiv an den AhR binden kann und als AhR Antagonist fungiert. Die in Ligandenbindungsexperimenten ermittelte Affinität von 7-Ketocholesterol zum AhR war ca.  $10^5$ -fach niedriger als die entsprechende Affinität von TCDD. Trotzdem war es mit Konzentrationen von 7-Ketocholesterol, wie sie auch im Blut gefunden werden, möglich die TCDD induzierte Genexpression in Zellkultur-experimenten zu inhibieren (Savouret et al., 2001). Obwohl 7-Ketocholesterol keinen AhR Agonisten, sondern einen AhR Antagonisten dargestellt, ist es möglich, dass es das erste identifizierte Mitglied einer neuen Gruppe von endogenen AhR Liganden ist, in der auch ein endogener Aktivator existieren könnte (Denison und Nagy, 2003).



**Abb. 8:** Übersicht verschiedener endogener AhR Liganden

### 3 Toxische und biochemische Effekte von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) und verwandten Verbindungen

#### 3.1 Übersicht der durch TCDD ausgelösten Effekte

2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) und verwandte Verbindungen lösen ein breites Spektrum an biochemischen und toxischen Effekten aus, die nach Spezies und Stamm, Geschlecht, Alter und Art der Applikation zum Teil beträchtlich variieren (Poland und Knutson, 1982; Pohjanvirta und Tuomisto, 1994) (Tab. 2).

**Tab. 2:** Übersicht über die TCDD-induzierten toxischen und biochemischen Effekte (modifiziert nach Denison und Heath-Pagliuso, 1998)

Dermale Toxizität <ul style="list-style-type: none"> <li>✦ Hyperkeratose</li> <li>✦ Chlorakne</li> </ul>	Modulation des Zellwachstums <ul style="list-style-type: none"> <li>✦ Proliferation und Differenzierung</li> <li>✦ Hyperplasie</li> </ul>
Lethalität <ul style="list-style-type: none"> <li>✦ Auszehrungssyndrom</li> </ul>	Hepatotoxizität
Kanzerogenität <ul style="list-style-type: none"> <li>✦ Tumorpromotion</li> </ul>	Induktion der Genexpression
Teratogenität <ul style="list-style-type: none"> <li>✦ Gaumenspalten</li> <li>✦ Hydronephrosen</li> <li>✦ Totgeburten</li> </ul>	Neurotoxizität <ul style="list-style-type: none"> <li>✦ Modulation der elekt. Synapsen</li> <li>✦ Motorische und kognitive Störungen</li> </ul>
Immunotoxizität <ul style="list-style-type: none"> <li>✦ Immunsuppression</li> <li>✦ Thymus-Atrophie</li> </ul>	Endokrine Disruption <ul style="list-style-type: none"> <li>✦ Veränderter Fettstoffwechsel</li> <li>✦ Inhibierung des Glucosestoffwechsels</li> <li>✦ Verringerte Thyroidgehalte im Serum</li> <li>✦ Vitamin A Erschöpfung</li> <li>✦ Porphyrie (Störung der Hämbiosynthese)</li> </ul>

Die meisten Daten zu den durch TCDD und verwandte Verbindungen ausgelösten Effekten stammen aus Versuchstieren, während einige Effekte auch beim Menschen beobachtbar sind. Hinsichtlich der *akuten Toxizität* und Empfindlichkeit gegenüber TCDD bestehen zwischen den Spezies, zum Teil auch innerhalb von Spezies deutliche Unterschiede, wie sich im Vergleich der letalen Dosen einzelner Tierarten zeigt. So beträgt der LD<sub>50</sub> für die orale Aufnahme von TCDD beim Meerschweinchen (als empfindlichste Tierart) ca. 1 µg/kg Körpergewicht (Schwetz et al., 1973), während Hamster (als unempfindlichste Tierart) einen LD<sub>50</sub> von ca. 3000 µg/kg Körpergewicht (Olson et al., 1980) aufweisen. Charakteristisch für die toxische Wirkung von TCDD ist die verzögerte Reaktion auf die akute Exposition. Der Zeitraum zwischen Exposition und Eintritt des Todes des Versuchstiers variiert je nach Spezies und beträgt bis zu acht Wochen. Dem Tod geht dabei in der Regel das sogenannte „*wasting syndrome*“ („Auszehrungssyndrom“) voraus. Hierbei kommt es zum Verlust an Körpergewicht, hauptsächlich an Fett- und Muskelgewebe, wobei der Verlust bis zu 50 % des Körpergewichts betragen kann. Das „*wasting syndrome*“ entwickelt sich langsam bis zum Eintritt des Todes und kann nicht ausschließlich auf eine verminderte Nahrungsaufnahme (Appetitsuppression und Nahrungsverweigerung), auf Veränderungen im Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel (Enan und Matsumura, 1994; Olsen et al., 1998) oder auf die Fehlfunktion eines einzelnen Organs zurückgeführt werden. Stattdessen muss man davon ausgehen, dass die Kombination von multiplen Effekten schließlich zum Tode führt (Olson et al., 1980; McConnell et al., 1978; Gasiewicz et al., 1980).

TCDD wurde von der IARC (International Agency for Research on Cancer) als humanes Kanzerogen der Gruppe 1 („possible carcinogenic hazard to humans“) eingestuft. Diese Einstufung erfolgte auf Grundlage der in Tierstudien beobachteten Kanzerogenität und Hinweisen auf eine erhöhte Krebsrate bei Personen, die bei industriellen Unfällen mit hohen Dosen von TCDD exponiert wurden. Da TCDD keine direkte Interaktion mit der DNA eingeht, wird TCDD nicht als genotoxisch, sondern als *Tumorpromotor* eingestuft (IARC, 1997; Beebe et al., 1995).

Das *Immunsystem* gilt als einer der empfindlichsten Angriffspunkte für TCDD. Bei allen untersuchten Spezies waren nach Administration von TCDD nachteilige Effekte auf das Immunsystem beobachtbar, die sich primär durch den Verlust an Lymphgewebe, insbesondere im Thymus (Atrophie der Thymusdrüse) äußerten (Vos

und Moore, 1974). Darüber hinaus führte die Einwirkung von TCDD dazu, dass sowohl die zelluläre, als auch die humorale Immunantwort supprimiert wurde. So konnte in Tierversuchen der Einfluss von TCDD auf die Antikörperproduktion (Sulentic et al., 2000; Inouye et al., 2003), auf die B-Zellreifung (Thurmond und Gasiewicz, 2000) und die T-Zellaktivierung (Kerkvliet et al., 2002) nachgewiesen werden. Durch TCDD ausgelöste Veränderungen der Funktion des Immunsystems konnten auch mit einer vermehrten Anfälligkeit für bakterielle, parasitäre und virale Infektionen in Zusammenhang gebracht werden (Burlison et al., 1996; Luebke et al., 1994; Vorderstrasse et al., 2003). Diese traten bereits in Dosisbereichen auf, die unter denen lagen, die zu einer Depletion des lymphozytären Gewebes führen.

Bei chronischer Exposition gegenüber TCDD waren im Tierversuch Beeinträchtigungen der *Entwicklungs- und Reproduktionsfähigkeit* feststellbar. So wurden sowohl in männlichen als auch in weiblichen Versuchstieren Veränderungen in Morphologie und Funktion der Reproduktionsorgane beobachtet (Gray et al., 1995; Gray et al., 1997; Theobald und Peterson, 1997). Auch wird die Exposition von Arbeitern mit TCDD beim Unfall in Seveso (Italien) 1976 mit einem veränderten Geschlechterverhältnis bei deren Nachkommen (48 Mädchen zu 26 Jungen) in Verbindung gebracht (Mocarelli et al., 1996). Die Exposition der Mütter gegenüber nicht toxischen Konzentrationen an TCDD und verwandten Verbindungen kann in frühen Entwicklungsstufen beim Embryo strukturelle Schädigungen und Missbildungen wie z. B. Gaumenspalten und Hydro-nephrose hervorrufen und zu Totgeburten führen (Courtney und Moore, 1971; Huuskonen et al., 1994). TCDD wird deshalb als *Teratogen* eingestuft.

In jüngerer Zeit werden niedrige Dosen an Dioxin und dioxin-ähnlichen Verbindungen, v. a. von PCBs, auch mit *neurologischen und motorischen Störungen* sowie mit Störungen der kognitiven Entwicklung bei Kindern in Verbindung gebracht (Chen et al., 1994; Jacobsen und Jacobsen, 1996).

Ein weiterer Teilaspekt der durch Dioxine und verwandte Verbindungen ausgelösten toxischen Effekte ist die Störung endokriner Signalwege und Metabolismusprozesse. TCDD gilt als Prototyp eines *endokrinen Disruptors*, der z. B. Signalwege für Schilddrüsen- und Steroidhormone moduliert und somit das Gleichgewicht des Hormonsystems verändert (Pohjanvirta und Tumomisto, 1994). Verschiedene toxische

TCDD-Wirkungen auf den Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel (Olsen et al., 1998; Enan und Matsumura, 1994), von denen angenommen wird, dass sie auch an der Entstehung des Auszehrungssyndroms beteiligt sind, werden mit Veränderungen der Schilddrüsenfunktion in Zusammenhang gebracht. TCDD reduziert die Konzentration des Schilddrüsenhormons Thyroxin T4 über eine verstärkte Glucuronidierung (Potter et al., 1983; Schuur et al., 1997), sodass es in der Folge über einen negativen Rückkopplungsmechanismus in der Hypophyse zu einer erhöhten Sekretion des Thyreoidea-stimulierenden Hormons (TSH) kommt. Bei chronischer TCDD-Behandlung von Nagetieren führten langfristig erhöhte TSH-Spiegel zur Hypertrophie und Hyperplasie von Schilddrüsenfollikelzellen und schließlich zu Schilddrüsenkarzinomen (Sewall et al., 1995), die als sensitive Endpunkte der TCDD-Wirkung in Kanzerogenitätstests mit Nagetieren gelten (Marquart und Schäfer, 2004).

In verschiedenen Versuchstierspezies führte die Administration von TCDD zu Störungen der normalen *Proliferations- und Differenzierungsprozesse*, die sich in inadäquater Proliferation (Hyperplasie), inadäquater Differenzierung (Metaplasie), unzureichender Differenzierung (Dysplasie) bzw. Gewebsverlust (Hypoplasie) äußern können (McConnell und Moore, 1979).

Typisches Symptom der *Lebertoxizität* in Versuchstieren ist die Hepatomegalie, die durch Hypertrophie und Hyperplasie der Leberparenchymzellen entsteht. Als weitere Symptome einer durch TCDD induzierten Lebertoxizität können Nekrosen, zentrilobuläre Läsionen, Fettakkumulation, Pigmentablagerungen, Infiltration inflammatorischer Zellen und eine fibröse Proliferation in nekrotischen Bereichen auftreten (Marquart und Schäfer, 2004; Pohjanvirta und Tuomisto, 1994).

Des Weiteren wurden TCDD induzierte *Störungen des Retinoidstoffwechsels* (Brouwer et al., 1989), die Erschöpfung der hepatischen Vitamin A Vorräte (Fletcher et al., 2001; Kelley et al., 2000) sowie Veränderungen der Porphyrinsynthese, die sich in der Akkumulation des Hämvorläufers Porphyrin (Van Birgelen et al., 1996) äußern, beschrieben.

TCDD löst über den Ah Rezeptor die Transkription und Expression einer ganzen Reihe von Genen aus, wobei zahlreiche dieser Gene für *fremdstoffmetabolisierende Enzyme* kodieren (vgl. Abschnitt B 3.2).

Die meisten der hier beschriebenen durch TCDD ausgelösten Effekte wurden in Tiermodellen beobachtet. Hingegen sind beim Menschen nur wenige dieser Effekte eindeutig nachweisbar. Typische Symptome nach akuter Exposition gegenüber hohen Dioxinkonzentrationen sind beim Menschen Übelkeit, Erbrechen und Reizungen der Atemwege. Nach einer Latenzzeit von mehreren Wochen tritt die sogenannte *Chlorakne* auf, die zu den am besten untersuchten Effekten beim Menschen gehört. Diese persistente, akne-artige Hauterkrankung wird charakterisiert durch verstärkte Hyperplasie (Proliferation der Zellen), Hyperkeratose (veränderte Zelldifferenzierung) sowie durch eine veränderte Pigmentierung der Haut und kann an allen exponierten Hautstellen auftreten (Geusau et al., 2001). Beim Menschen sind bisher keine Todesfälle nach Exposition mit TCDD beschrieben. Aufgrund tierexperimenteller Untersuchungen, der Beobachtung von toxischen Wirkungen auf Menschen nach industriellen Unfällen bzw. nach chronischer Exposition am Arbeitsplatz und der großen Persistenz gelten Dioxine jedoch als Verbindungen mit hohem Gefährdungspotential. Die Extrapolation der TCDD-Wirkungen von Tierstudien auf den Menschen wird aber insbesondere durch spezies- und gewebe-spezifische Effekte erschwert. Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion sind die Folgen einer Exposition gegenüber niedrigen, umwelt-relevanten Konzentrationen an TCDD, den dadurch ausgelösten Effekten und einer möglichen nachteiligen Beeinflussung der menschlichen Gesundheit (Marquardt und Schäfer, 2004).

## 3.2 Übersicht über die durch AhR Liganden und Induktoren regulierten Genprodukte

Zu den am besten untersuchten und verstandenen biochemischen Effekten, die durch TCDD und andere verwandte Agonisten ausgelöst werden, gehört die Regulation verschiedener Genprodukte. Der Ah Rezeptor als ligand-abhängiger Transkriptionsfaktor vermittelt dabei die Expression zahlreicher Enzyme der sogenannten AhR Genbatterie, von denen viele an der Biotransformation von endogenen und exogenen Verbindungen beteiligt sind. Zu diesen Metabolismusenzyemen gehören Cytochrom 1A1 (Gonzalez et al., 1984; Neuhold et al., 1989), Cytochrom 1A2 (Quattrochi et al., 1994; Black und Quattrochi, 2004) und Cytochrom 1B1 (Sutter et al., 1994; Shehin et al., 2000) sowie Glutathion-S-Transferase Ya (Rushmore et al., 1990; Pimental et al., 1993), UDP-Glucuronyltransferase (Robertson et al., 1987; Münzel et al., 1996), NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase (Favreau und Pickett, 1991; Jaiswal, 1994) und Aldehyd-3-Dehydrogenase (Vasiliou et al., 1996; Takimoto et al., 1994) (Tab. 3), deren zugehörige Gene ein oder mehrere „*dioxin responsive elements*“ (DREs) in den regulatorischen Regionen aufweisen.

Die Cytochrome als NADPH-abhängige Monooxygenasen katalysieren Phase I-Reaktionen der Biotransformation, die zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit der Substrate führen. Die weiteren oben aufgezählten Enzyme gehören zu den Metabolismusenzyemen der Phase II. Diese sind an der Konjugation der polaren Metabolite mit Glutathion- und Glucuronylgruppen beteiligt und führen so zur Eliminierung des Metabolits aus dem Körper. Zahlreiche AhR Liganden, die AhR vermittelt Metabolismusenzyme induzieren, dienen diesen gleichzeitig als Substrat, was darauf schliessen lässt, dass die Enzyme der AhR Genbatterie ein Teil des Abwehrsystems zur Eliminierung der Induktoren und ihrer Metaboliten sind (Schrenk, 1998). Bei einigen Liganden führen die katalysierten Reaktionen allerdings nicht zu einer Detoxifikation, sondern zur Bioaktivierung der Ausgangssubstanzen. Die dabei entstehenden toxischen und reaktiven Metabolite können mit Proteinen und Nukleinsäuren wechselwirken und zu karzinogenen, mutagenen und cytotoxischen Effekten führen („chemical carcinogenesis“). So wird z. B. der AhR Agonist Benzo[a]pyren durch Cytochrome zu hoch-reaktiven Diolepoxiden metabolisiert, die mit der exozyklischen Aminogruppe des

Guanosins reagieren und somit zu DNA-Schädigungen führen (Marquardt und Schäfer, 2004).

**Tab. 3:** Genprodukte, die durch AhR Liganden und Induktoren reguliert werden (modifiziert nach Denison et al., 1998a)

---

### **Genprodukt**

---

#### **Genprodukte, die der AhR Regulation unterliegen**

Cytochrom P450 1A1  
 Cytochrom P450 1A2  
 Cytochrom P450 1B1  
 Gluthation S-Transferase Ya  
 NAD(P)H Chinon Oxidoreduktase 1  
 UDP-Glucuronyltransferase 1 \*06  
 Aldehyd-3-Dehydrogenase  
 $\gamma$ -Aminolevulinic Acid Synthase  
 Prostaglandin Endoperoxid H Synthase 2

#### **Genprodukte, die möglicherweise der AhR Regulation unterliegen**

Interleukin-1 $\beta$   
 Plasminogenaktivator Inhibitor Typ 2  
 Transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2)  
 Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )  
 Ornithindecaboxylase  
 Cyclooxygenase 2  
 Keratin 17  
 Tyrosinkinase  
 Cholinkinase  
 Lipoprotein-Lipase  
 AhRR  
 c-fos  
 Jun-B  
 c-jun  
 Jun-D  
 p27

---

Neben den Genen für Phase I- und Phase II-Metabolismusenzymer wurden weitere Gene identifiziert, die DRE Sequenzen in ihren regulatorischen Regionen enthalten und die durch AhR Liganden, vorwiegend TCDD, induziert werden können und die somit auch zu den Zielgenen („target genes“) des AhR vermittelten Signaltransduktionswegs gezählt werden. Zu dieser Gruppe von AhR regulierten Genprodukten gehören Proteine,

die an Entzündungsprozessen beteiligt sind, wie Cyclooxygenase-2 (Puga et al., 1997; Mizuyachi et al., 2002), Interleukin-1 $\beta$  (Sutter et al., 1991), Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 2 (Sutter et al., 1991) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Clark et al., 1991) sowie Proteine, die Wachstums- und Differenzierungsprozesse beeinflussen wie z. B. die transformierende Wachstumsfaktoren  $\alpha$  und  $\beta$ 2 (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 2) (Gaido et al., 1992). Neben der Aktivierung von Proteinkinasen (Ma und Babish, 1993; Enan und Matsumura, 1996) und Proto-Onkogenen (c-fos, jun-B) (Hoffer et al., 1996; Puga et al., 1992) wurde auch der Eingriff von TCDD in die Regulation von Proteinen beschrieben, die Zellzyklusregulation (p27) (Kolluri et al., 1999) und Apoptose (Bax) (Matikainen et al. 2001) steuern.

Die AhR-Arnt-abhängige Vermittlung der Geninduktion wurde jedoch nur für einen Teil dieser Gene nachgewiesen, während für die Mehrzahl dieser Genprodukte der Mechanismus der durch TCDD ausgelösten Genexpression noch weitgehend unklar ist. Es wird angenommen, dass die verschiedenen biochemischen und toxischen Effekte von TCDD durch zahlreiche Proteinfaktoren moduliert werden könnten, die mit TCDD und / oder dem AhR-TCDD-Komplex interagieren. Es ist jedoch auch vorstellbar, dass ein Teil der durch TCDD ausgelösten Wirkungen unabhängig vom Ah Rezeptor und der Expression von DRE-regulierten Genen erfolgt.

### **3.3 Mögliche Mechanismen der TCDD Toxizität**

Obwohl das von TCDD verursachte breite Spektrum an biochemischen und toxikologischen Effekten wie Teratogenität, Immunsuppression und Tumorpromotion seit langem bekannt ist, wurde bisher kein eindeutiger Mechanismus für die Entstehung dieser Effekte beschrieben. Es ist jedoch unstrittig, dass der Ah Rezeptor eine entscheidende Bedeutung bei der Vermittlung der durch TCDD und anderer HAHs induzierten Toxizität aufweist: So zeigten QSAR („Quantitative Structure Activity Relationship“) Untersuchungen, dass eine hohe Korrelation zwischen Struktur und AhR-Bindung einzelner HAHs und deren toxischem Potential besteht (Safe, 1990). Mäusestämme, die fehlerhafte Ah Rezeptoren mit einer zehnfach niedrigeren Affinität zu TCDD exprimierten, benötigten entsprechend höhere Dosen an TCDD, um toxische Effekte des gleichen Ausmaßes wie bei „normalen“ Mäusen zu erreichen (Nebert, 1989;

Okey et al., 1989). Das stärkste Indiz für die Beteiligung des Ah Rezeptors an der Vermittlung der meisten, wenn nicht sogar aller toxischen Effekte wurde durch die fehlende Toxizität von TCDD in AhR Knockout Mäusen erbracht (Fernandez-Salguero et al., 1996, Mimura et al., 1997, Shimizu et al., 2000). Für die Entstehung der komplexen Toxizität von TCDD werden verschiedene biochemische Aspekte des AhR Signaltransduktionswegs wie eine veränderte Genexpression, die Beeinflussung von Proliferations-, Differenzierungs- und Zellzyklusprozessen und Interaktionen („cross-talk“) mit anderen Signaltransduktionswegen diskutiert.

### 3.3.1 Veränderungen der Genexpression

Die Exposition gegenüber TCDD und anderen AhR Liganden und die daran anschließende Aktivierung des Ah Rezeptors führt zu einer veränderten Expression einer Vielzahl von Enzymen und anderen Genprodukten. Eine veränderte Genexpression ist prinzipiell bei allen AhR Induktoren beobachtbar, toxische Effekte wie bei TCDD werden aber nur durch wenige AhR Liganden hervorgerufen. Solche Liganden zeichnen sich durch eine sehr hohe Bindungsaffinität zum Ah Rezeptor aus und sind gegenüber metabolischen Abbauprozessen stabil. Es wird angenommen, dass eine kontinuierliche, unangemessene Aktivierung des AhR Signaltransduktionswegs durch metabolisch stabile Liganden, wie TCDD, und die damit verbundenen persistenten Veränderungen der Genexpression für die Toxizität dieser Verbindungen verantwortlich ist. So konnten Andersson und Mitarbeiter (2002) zeigen, dass ein konstitutiv aktiver Ah Rezeptor bei transgenen Mäusen zu einer verringerten Lebensdauer und zu Magentumoren führte. Für eine persistente Aktivierung als Auslöser der Toxizität spricht auch, dass die toxischen Effekte von TCDD und verwandten Verbindungen erst Tage bis Wochen nach Exposition gegenüber diesen Verbindungen auftreten.

Von einer persistenten Aktivierung des AhR Signaltransduktionswegs sind vorrangig Gene betroffen, die für verschiedene Phase I- und Phase II-Enzyme, wie CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UDP-Glucuronyltransferase, NADP(H):oxidoreduktase und GST-Ya kodieren (vgl. Abschnitt B 3.2). Primär stellt die AhR vermittelte Expression dieser Metabolismusenzyime einen Schutzmechanismus gegen toxische Umweltkontaminaten

(Xenobiotika) dar, da diese Enzyme die Metabolisierung von lipophilen Substraten in wasserlösliche Derivate katalysieren und somit zu einer beschleunigten Elimination dieser Verbindungen aus dem Organismus beitragen (Detoxifizierung). Andererseits können die durch den AhR vermittelten oxidativen Metabolismusprozesse auch zur Entstehung hochaktiver karzinogener Metabolite führen (metabolische Aktivierung), sodass auch ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung des AhR Signalwegs und der chemischen Karzinogenese hergestellt werden kann (Shimizu et al., 2000).

Neben den Genen für obige Metabolismusedzyme wurden in den letzten Jahren zahlreiche weitere Gene identifiziert, die durch DRE-Sequenzen reguliert werden und deren AhR vermittelte Expression nachgewiesen wurde bzw. angenommen wird (vgl. Abschnitt B 3.2 bzw. Tab. 3). Eine Übersicht aller durch TCDD beeinflussten Genprodukte ergab sich aus der Analyse TCDD induzierter Veränderungen der Genexpression mittels eines cDNA Microassays in der humanen Leberzelllinie HepG2 (Frueh et al., 2001). Obwohl diese Studie nur ungefähr ein Drittel der in HepG2 exprimierten Gene untersuchte, konnten anhand der mRNA Expressionsmuster 112 Gene identifiziert werden, deren Aktivität in den mit TCDD behandelten HepG2 Zellen entweder hinauf- oder hinuntergeregelt wurde (Frueh et al., 2001). Die Komplexität der durch TCDD induzierten toxischen und biologischen Effekte spiegelte sich auch in dieser Studie wider, da zwischen den identifizierten Genen keine erkennbare Verwandtschaft bestand.

### **3.3.2 Einfluss auf Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellzyklus und Apoptose**

Viele der durch TCDD induzierbaren Genprodukte sind an der Regulation von Zellproliferation und Zelldifferenzierung, von Zellzyklus und Apoptose beteiligt. Fehlgesteuerte Differenzierungs- und Proliferationsvorgänge werden beispielsweise für entwicklungstoxische Effekte wie Gaumenspalten und Hydronephrose sowie für die bei Chlorakne auftretende Hyperkeratose und epidermale Entzündungsprozesse verantwortlich gemacht. Als Ursache dieser Effekte gelten Veränderungen im Gleichgewicht verschiedener Wachstumsfaktoren und Cytokine, wie z. B. TGF $\alpha$ , EGF, Il-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , in den entsprechenden Zielgeweben (Fan et al., 1997; Abbott et al., 2003). Durch TCDD induzierte Apoptose wird mit den charakteristischen morphologischen

Veränderungen im Thymusgewebe (Thymusatrophie) in Verbindung gebracht (Kamath et al., 1997) und wurde auch in Maus-Oozyten nachgewiesen (Matikainen et al., 2001). Daneben liefern einige Studien Anhaltspunkte, dass der Ah Rezeptor eine duale Rolle bei der Modulation des Zellzykluses spielt. Es konnte gezeigt werden, dass TCDD ein Anhalten des Zellzykluses in der G<sub>1</sub> Phase induziert und dies auf eine erhöhte Expression des Proteins p27 zurückzuführen ist (Kolluri et al., 1999). p27 ist ein Inhibitor der cyclin-abhängigen Kinase 2 (cdk 2), die für den Übergang der G<sub>1</sub>-Phase in die anschließende S-Phase notwendig ist. Weiteren Einfluss auf den Zellzyklus nimmt TCDD durch eine ebenfalls erhöhte Expression des Retinoblastomproteins pRb (Ge und Elferink, 1998), das als Kontrollprotein des G<sub>1</sub>-Kontrollpunkts fungiert und das zum Einleiten der S-Phase durch die cyclin-abhängige Kinase 2 phosphoryliert und somit inaktiviert werden muss. Im Gegensatz dazu ist jedoch auch beschrieben, dass in Abwesenheit von exogenen Liganden der Ah Rezeptor das Fortschreiten des Zellzykluses fördert (Ma und Whitlock, 1996; Levine-Fridman et al., 2004).

### 3.3.3 Wechselwirkungen mit anderen Signalwegen

Weitere potentielle Mechanismen der Toxizität von TCDD ergeben sich aus den vielfältigen Wechselwirkungen („cross-talk“) des AhR Signaltransduktionswegs mit anderen Signalwegen.

So kann der Ah Rezeptor mit dem *NF-κB Signalweg* (Tian et al., 1999), dem *Östrogenrezeptor* (Safe et al., 1998; Wang et al., 1998) und dem *Retinoblastoma Protein Rb* (Ge und Elferink, 1998; Puga et al., 2000) interagieren. Über den gemeinsamen Dimerisationspartner Arnt des Ah Rezeptors und des durch Hypoxie induzierbaren Faktors HIF-1α besteht auch eine direkte Wechselwirkung zwischen dem AhR Signalweg und dem *Signalweg für Hypoxie* (Chan et al., 1999; Nie et al., 2001). Daneben wurde auch vorgeschlagen, dass durch den AhR Signalweg generierter oxidativer Stress zu den toxischen Effekten von TCDD beitragen könnte (Dalton et al., 2002). Aufgrund der beschriebenen Beeinflussung der Vitamin A-Homöostase durch TCDD in Versuchstieren wird außerdem eine Interaktion zwischen dem Ah Rezeptor Signalweg und den *Retinoid-Rezeptoren* diskutiert (Lorick et al., 1998). Einige Studien beschreiben auch einen Einfluss von *Proteinkinase C* (PKC) Signalwegen und von

*Tyrosinkinasen* auf den Phosphorylierungszustand des Ah Rezeptors (Long et al., 1998; Park et al., 2000). Diese Wechselwirkungen beruhen vermutlich nicht auf direkten Interaktionen der Proteine, sind bisher jedoch nur ansatzweise aufgeklärt und Gegenstand weiterer Untersuchungen (Carlson und Perdew, 2002).

## 4 Bioassays für AhR Liganden

### 4.1 Einführung

Neben der klassischen instrumentellen Rückstandsanalytik von halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen (HAHs) und verwandten Verbindungen mittels HR-GC-MS-Techniken (Smith et al., 1984; Liem, 1999) haben sich in den letzten fünfzehn Jahren verschiedene Bioassay-Systeme, insbesondere zu Screeningzwecken, etabliert, die auf AhR Liganden ansprechen. Diese Bioassays nutzen AhR-haltige Extrakte oder Säugerzellkulturen, um eine spezifische biologische Antwort, wie z. B. Enzyminduktion, AhR-Ligand-Bindung und AhR-DNA-Bindung, zu messen. Die gängigsten AhR-abhängigen Bioassays beruhen dabei auf der Messung der Induktion von Genexpressionen, wobei die Stärke der Induktion relativ zum prototypischen AhR-Liganden TCDD angegeben wird. Die Bioassays erlauben die Gewinnung von mechanistischen Erkenntnissen über die Ligandenbindung an den Ah Rezeptor und über den Ablauf des Signaltransduktionswegs. Sie dienen gleichzeitig auch zur Detektion und Charakterisierung von Dioxinen und dioxin-ähnlichen Verbindungen in biologischen Proben. Über diesen Nachweis von AhR Agonisten hinaus, ermöglichen sie auch eine Abschätzung der relativen biologischen und toxischen Potenz enthaltener komplexer Mischungen an Dioxinen und dioxin-ähnlichen Verbindungen (Brouwer et al., 1995). Die Bioassays zeichnen sich gegenüber der kongener-spezifischen instrumentellen Analyse durch eine schnellere und weniger kostenintensive Durchführung aus. Die wichtigsten zur Identifizierung und Charakterisierung von AhR Liganden eingesetzten Bioassays sowie deren Vor- und Nachteile sollen im Folgenden näher vorgestellt werden.

## 4.2 Spezielle Bioassays für AhR Liganden

Die Identifizierung des Ah Rezeptors als ein ligand-abhängiger Transkriptionsfaktor, führte zur Entwicklung zahlreicher biologischer Testsysteme, die auf dem AhR-abhängigen Signaltransduktionsmechanismus basieren. Diese auf AhR Liganden ansprechende Bioassays beleuchten dabei verschiedene Aspekte der molekularen Wirkmechanismen im AhR Signaltransduktionsweg:

So wurden *Liganden-Bindungsassays* entwickelt, die die Fähigkeit einer Verbindung messen [<sup>3</sup>H]-TCDD aus seiner spezifischen Bindung an den Ah Rezeptor kompetitiv zu verdrängen (Bradfield und Poland, 1988; Denison et al., 1984; Gasiewicz und Neal, 1982). Mittels dieser Liganden-Bindungsassays können jedoch keine Aussagen getroffen werden, ob eine Verbindung fähig ist, den Ah Rezeptor zu aktivieren, d. h. diese Assays erlauben keine Unterscheidung von AhR Agonisten und Antagonisten und ermöglichen auch keine Aussage über die biologische Aktivität der untersuchten Verbindungen. Aufgrund der sehr hohen Bindungsaffinität von TCDD zum Ah Rezeptor ist es außerdem schwierig schwache Agonisten mit einer deutlich geringeren Bindungsaffinität zu identifizieren.

*Gelretardation Assays (GRA)* mit „dioxin-responsive elements“ (DRE) enthaltenden Oligonukleotiden werden zur Analyse, ob eine Verbindung *in vitro* befähigt ist, die Transformation des Ah Rezeptors in seine hoch-affine DNA-Bindungsform hervorzurufen, eingesetzt (Denison und Yao, 1991; Heath-Pagliuso et al., 1998). Diese *in vitro* Fähigkeit korreliert jedoch nicht immer mit der Fähigkeit einer Verbindung die AhR-abhängige Genexpression in intakten, lebenden Zellen zu induzieren (Seidel et al., 2000).

Eine wichtige Grundlage für weitere Bioassays stellt die AhR-abhängige Induktion des Enzyms CYP1A1 dar. So wurde ein Assay entwickelt, der die Fähigkeit von Verbindungen misst, die CYP1A1 abhängige Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Aktivität zu induzieren. Mit Hilfe des empfindlichen *EROD-Assays* konnten erstmals große Probenzahlen relativ schnell untersucht und bis dato unbekannte AhR Agonisten identifiziert werden (Sawyer und Safe, 1982; Kennedy et al., 1993; Behnisch et al., 2000). Als nachteilig erwies sich jedoch, dass zahlreiche CYP1A1-Induktoren gleich-

zeitig als Substrate bzw. als Inhibitoren von CYP1A1 wirken, was in einer signifikanten Unterbewertung der Induktionspotentials einiger dieser Verbindungen resultierte.

Die in der Folge entwickelten *rekombinanten Zellbioassays* zeichnen sich durch eine stark vereinfachte Messung der Proben aus und erlauben daher die Messung großer Probenzahlen („high-throughput“). Die rekombinanten Zellbioassays basieren auf Säugerzelllinien, die mit empfindlichen Reportergenen unter der Kontrolle von AhR-responsiven DREs aus der 5'-Regulationsregion des CYP1A1 Gens stabil transfiziert wurden (El-Fouly et al., 1994; Garrison et al., 1996; Murk et al., 1996; Postlind et al., 1993; Sanderson et al., 1996; Ziccardi et al., 2000; Nagy et al., 2002). Die rekombinanten Bioassays beruhen, wie der EROD-Assay, auf dem AhR-abhängigen Mechanismus der Signaltransduktion. Die Reportergene bzw. deren Genprodukte sind jedoch empfindlicher und leichter zu detektieren und ihre Aktivität wird nicht durch die Induktoren inhibiert.

Die Anwendungsbereiche dieser rekombinanten Bioassays sind vielfältig. So werden sie zum Screening von biologischen Materialien und Umweltproben (z. B. Blutextrakte und Sedimente) eingesetzt und erlauben die Bewertung dieser Proben hinsichtlich ihres Gehaltes an halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen (HAHs), auf deren Grundlage eventuell eine anschließende Untersuchung mit klassischen Analysemethoden erfolgen kann. Daneben bieten die Reportergenassays auch die Möglichkeit, Wirkmechanismen und mögliche Wechselwirkungen im AhR vermittelten Signaltransduktionsweg aufzuklären. Nicht zuletzt dienen die rekombinanten Bioassays zur Identifizierung und Charakterisierung von bisher unbekanntem AhR Liganden, wobei in jüngerer Zeit neben neuen Agonisten auch antagonistisch wirksame Verbindungen in das wissenschaftliche Interesse gerückt sind.

## **4.3 Reportergenassays**

### **4.3.1 Definition der Reportergene**

Reportergene sind DNA Sequenzen, die ein induzierbares oder ein konstitutives Promotorelement enthalten, das die Expression eines leicht messbaren Proteins bzw. Enzyms kontrolliert. Dieses Reporterprotein weist in der Regel eine einzigartige Aktivität bzw. Struktur auf, die es ermöglicht das Reporterprotein von anderen Proteinen zu unterscheiden und es mittels kolorimetrischer, fluorimetrischer oder luminometrischer Assays zu vermessen. Die Messung der Aktivität des Reporterproteins erlaubt eine indirekte Bestimmung der transkriptionalen Aktivität der Promotorsequenz.

Induzierbare Reportergene werden erst nach erfolgter Aktivierung der entsprechenden Promotorregion, z. B. durch Bindung eines Transkriptionsfaktors, exprimiert. Solche Reportergene werden zur Charakterisierung von regulatorischen Sequenzen, von Transkriptionsfaktoren und von rezeptor-vermittelten Veränderungen der Genexpression eingesetzt. Daneben gibt es auch konstitutive Reportergene, die einen Promotor enthalten, der dauerhaft aktiv ist. Das entsprechende Reporterprodukt wird somit kontinuierlich exprimiert. Konstitutive Reportergene werden oft zur Markierung von endogenen Proteinen eingesetzt, indem die Reporter-DNA an die DNA des endogenen Gens angehängt wird („tagging“). Solche Proteinkonstrukte werden Fusionsproteine genannt und erlauben es, die Lokalisation, Verteilung und Dynamik von Proteinen intra- und interzellulär zu verfolgen („tracking“) (Clemons und Zacharewski, 1999; Ignar und Rees 2000).

### **4.3.2 Übersicht über die gängigsten Reportergensysteme**

Tabelle 4 zeigt eine Übersicht gängiger Reportergensysteme. Die verschiedenen Reportergensysteme unterscheiden sich stark hinsichtlich ihrer Detektionsgrenzen, Spezifität, Stabilität und der Aufwendigkeit der Assay-Durchführung.

Die Auswahl des geeignetsten Reportergensystems für eine spezifische Fragestellung richtet sich nach folgenden Kriterien: Das Reporterprotein sollte im Wirtsorganismus

---

endogen nicht vorhanden oder zumindest von endogenen Varianten leicht unterscheidbar sein. Das Reporterprotein sollte sich mittels eines einfachen, schnellen, empfindlichen und kostengünstigen Assays detektieren lassen. Der Assay für das Reporterprotein sollte einen breiten linearen Messbereich besitzen, um die Analyse von großen, als auch kleinen Veränderungen in der Promotoraktivität zu ermöglichen. Die Expression des Reportergens darf die Physiologie der Zellen bzw. Organismen nicht verändern. Jedes der verschiedenen Reportergene und korrespondierenden Assaysysteme bietet aufgrund seiner spezifischen Eigenheiten Vorteile und Einschränkungen, die für die Auswahl des Systems berücksichtigt werden müssen (Current Protocols in Molecular Biology, 2003).

**Tab. 4:** Übersicht der gängigsten Reportersysteme (Current Protocols in Molecular Biology, 2003; Daunert et al., 2000; Köhler et al., 2000)

Reporterprotein	Gen	Herkunft	Katalysierte Reaktion	Detektion
Chloramphenicol-acetyltransferase (CAT)	<i>Cat</i>	<i>E. coli</i>	$\text{CM} + \text{CoA} \rightarrow 3\text{-Acetyl-CM} + \text{CoA}$ $3\text{-Acetyl-CM} \leftrightarrow 1\text{-Acetyl-CM}$ $1\text{-Acetyl-CM} + \text{Acetyl-CoA} \rightarrow 1,3\text{-Diacetyl-CM} + \text{CoA}$	RI, FL
$\beta$ -Galactosidase	<i>LacZ</i>	<i>E. coli</i>	Hydrolyse von $\beta$ -Galactosiden	CR, FL, HC, CL, FL
Grün fluoreszierendes Protein (GFP)	<i>Gfp</i>	<i>Aequorea victoria</i>	Posttranslationale Bildung eines internen Chromophors (Autofluoreszenz)	FL
Bakterielle Luciferase	<i>Lux</i>	Lumineszente Bakterien	$\text{FMNH}_2 + \text{R-CHO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{FMN} + \text{H}_2\text{O} + \text{R-COOH} + h\nu$	BL
Insekten-Luciferase	<i>Luc</i>	<i>Photinus pyralis</i>	$\text{Luciferin} + \text{O}_2 + \text{ATP} \rightarrow \text{Oxyluciferin} + \text{AMP} + \text{Pi} + h\nu$	BL
$\beta$ -Glucuronidase (GUS)	<i>uidA</i>	<i>E. coli</i>	Hydrolyse von $\beta$ -Glucuroniden	CR, HC, FL, CL
Alkalische Phosphatase (AP)	<i>phoA</i>	Verschiedene Quellen	Dephosphorylierung zu gefärbten, fluoreszierenden bzw. biolumineszenten Produkten	CR, BL, FL

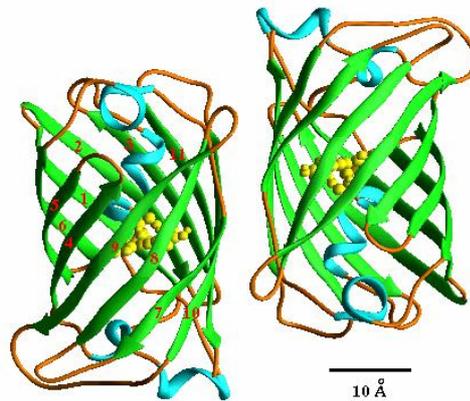
**Abkürzungen:** <sup>14</sup>C-markiertes Chloramphenicol bzw. fluoreszierende Derivate (CM), reduziertes Flavin-Mononucleotid (FMNH<sub>2</sub>), Flavin-Mononucleotid (FMN), Radiodetektion (RI), Fluoreszenz (FL), Colorimetrie (CR), Histochemische Detektion (HC), Elektrochemische Detektion (EC), Chemilumineszenz (CL), Biolumineszenz (BL)

### 4.3.3 GFP- und Luciferase-Reportersysteme

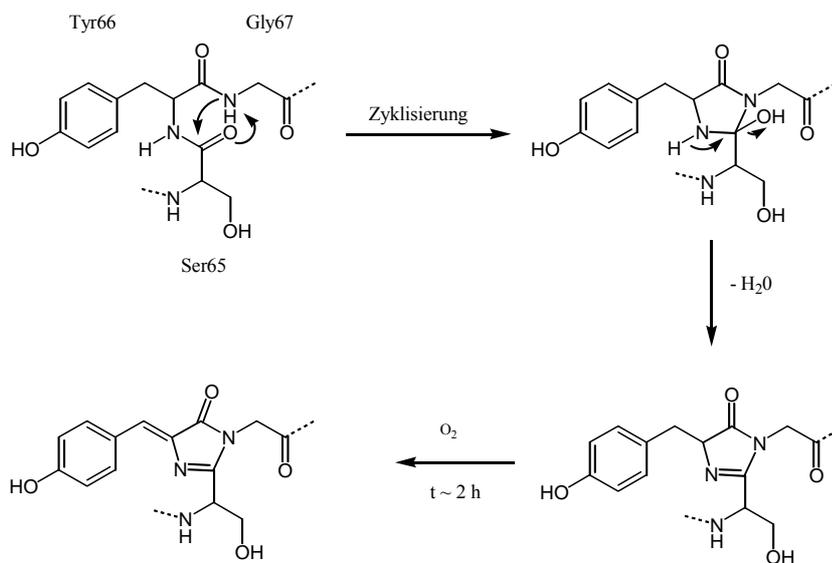
Sowohl GFP- als auch Luciferase-Reportergenassays sind aufgrund ihrer Eigenschaften sehr häufig eingesetzte Reportersysteme, deren Einsatzbereiche von bakteriellen und pflanzlichen Systemen bis hin zu Hefe- und Säugerzellen gehen. Da im Rahmen dieser Arbeit ein GFP- und ein Luciferase-Reportersystem verwendet wurde, sollen diese beiden Systeme hier näher vorgestellt werden.

#### 4.3.3.1 Das grün fluoreszierende Protein (GFP)

Das grün fluoreszierende Protein (GFP, green fluorescent protein) ist ein Photoprotein, das aus der pazifischen Quallenart *Aequorea victoria* stammt. Indem es die Anregungsenergie der weniger effizienten Chemilumineszenz-Reaktion des Photoproteins Aequorin absorbiert und mit hoher Quantenausbeute abstrahlt, kann dieser Meeresorganismus Biolumineszenz erzeugen (Chalfie et al., 1994). Die Klonierung und Sequenzierung von GFP durch Prasher und Mitarbeiter (1992) ermöglichte die rekombinante Expression des Proteins in pro- und eukaryotischen Systemen und den Einsatz von GFP als Reporterprotein (Chalfie et al., 1994). Das GFP-Molekül weist eine fassartige Struktur aus elf  $\beta$ -Faltblatt-Strängen auf, deren Achse mit einer  $\alpha$ -Helix durchzogen ist (Abb. 9) (Omrö et al., 1996; Yang et al., 1996a). Die fluorophore Gruppe des GFP ist Teil dieser inneren  $\alpha$ -Helix und liegt nahezu im geometrischen Zentrum des Proteins. Der eigentliche Fluorophor ist ein p-Hydroxybenzylidenimidazolinon, das sich autokatalytisch aus der Tripeptidsequenz Serin<sup>65</sup>-Tyrosin<sup>66</sup>-Glycin<sup>67</sup> innerhalb der 238 Aminosäuren umfassenden Polypeptidkette bildet. Die Bildung des Chromophors erfolgt posttranslational durch Zyklisierung des Peptidrückgrats zwischen Serin<sup>65</sup> und Glycin<sup>67</sup>, Kondensation des Heterozyklus unter Wasserabspaltung und Oxidation zum p-Hydroxybenzylidenimidazolin-5-on (Cubitt et al., 1995) (Abb. 10).



**Abb. 9:** Raumstruktur des grün fluoreszierenden Proteins (Yang et al., 1996a)



**Abb. 10:** Bildung des eigentlichen Fluorophors von GFP durch Zyklisierung, Dehydrierung und Oxidation des Tripeptids aus Serin<sup>65</sup>, Tyrosin<sup>66</sup> und Glycin<sup>67</sup> (Cubitt et al., 1995)

Das Wildtyp-GFP Molekül absorbiert UV-Licht und blaues Licht bei einem Hauptabsorptionsmaximum von 395 nm und einem weiteren (kleineren) Maximum bei 470 nm. Die Emission von grünem Licht erfolgt bei einem Emissionsmaximum von 509 nm mit einer Peakschulter bei 540 nm (Ward et al., 1980). Daneben wurden mehrere GFP Mutanten entwickelt, die ein oder mehrere Aminosäure-Substitutionen in

der Chromophor-Region aufweisen und die hinsichtlich ihrer Fluoreszenz, ihrer Stabilität und ihrer spektralen Eigenschaften gegenüber dem Wildtyp-GFP verbessert sind (Heim und Tsien, 1996) (Tab. 5). So führte der Austausch der Aminosäuren Phe<sup>64</sup> durch Leu<sup>64</sup> und Ser<sup>65</sup> durch Thr<sup>65</sup> zur EGFP-Mutante („enhanced green fluorescent protein“), die ein einzelnes Anregungsmaximum bei 488 nm aufweist. Aufgrund eines größeren Extinktionskoeffizienten und einer erhöhten Effizienz der Chromophorbildung erzielt EGFP gegenüber dem Wildtyp-GFP eine rund 35-fach höhere Intensität des Fluoreszenzsignals (Cormack et al., 1996; Yang et al., 1996b).

**Tab. 5:** Übersicht einiger GFP-Mutanten und ihrer spektralen Eigenschaften (Clontech Living Colors® User Manual)

Mutante	Mutationen	Excitationsmax. (nm)	Emissionsmax. (nm)
Wildtyp GFP		395 (470)	509
EGFP Enhanced Green Fluorescent Protein	Phe-64-Leu ; Ser-65-Thr	488	509
EBFP Enhanced Blue Fluorescent Protein	Phe-64-Leu ; Tyr-66-His Ser-65-Thr ; Tyr-145 Phe	380	440
EYFP Enhanced Yellow Fluorescent Protein	Ser-65-Gly ; Val-68-Leu Ser-72-Ala ; Thr-203-Tyr	513	527
ECFP Enhanced Cyan Fluorescent Protein	Tyr-66-Trp ; Phe-64-Leu Ser-65-Thr ; Asn-146-Ile Met-153-Thr ; Val-163-Ala	433 (453)	475 (501)

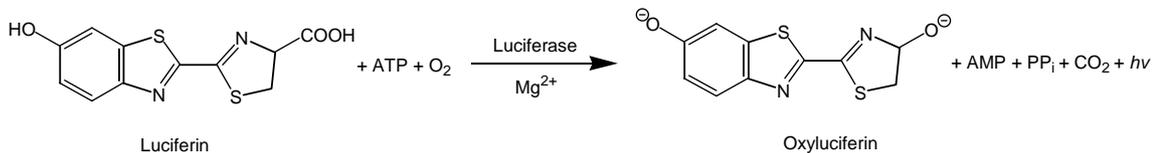
Der Hauptvorteil der Verwendung von GFP als biologisches Markermolekül liegt in der Autofluoreszenz des Proteins, für deren Ausbildung keine Zugabe von exogenen Kofaktoren oder Substraten erforderlich ist. Ein wichtiger Aspekt ist auch die hohe Stabilität des Proteins in lebenden Systemen. So ist GFP im pH-Bereich von 5 - 12, bei Temperaturen bis 65 °C und gegenüber Proteasen sehr stabil (Tsien, 1998; Clontech Living Colors® User Manual), was sich in einer Halbwertszeit von größer als

24 Stunden für GFP äußert (Corish und Tyler-Smith, 1999). Des Weiteren bietet die nicht-invasive, zerstörungsfreie, einfache und direkte Fluoreszenzmessung zahlreiche Vorteile gegenüber klassischen Reporterenzymen, die eine Zellyse mit anschließender enzymatischer Umsetzung erfordern. Durch Kopplung des GFP-Gens an zu untersuchende Gene und gemeinsame Transkription und Translation beider Gene kann die GFP-Fluoreszenz die Stärke der Genexpression bzw. die Lokalisation des Genprodukts anzeigen. Aufgrund der relativ geringen Toxizität von GFP in Zellen und der einfachen Detektion wird GFP somit als Reporterprotein bei Genexpressionsstudien eingesetzt. Da das grün fluoreszierende Protein sehr klein ist und keine Veränderungen der Funktion und Lokalisation von Fusionspartnern induziert, ist es zur Visualisierung von Proteinen in lebenden Zellen und Organismen außerordentlich gut geeignet.

Ein Nachteil von GFP als Reporterprotein ergibt sich daraus, dass das Signal von GFP keiner Amplifikation unterliegt. Da GFP kein Enzym ist, das katalytisch mehrere Substratmoleküle umsetzt, sondern jedes GFP-Molekül maximal ein Fluorophor aufweist und somit nur ein einziges Signal produziert, wird nicht die Empfindlichkeit von enzymatischen Reaktionen wie z. B. mit Luciferase erreicht. Aufgrund der hohen Stabilität von GFP und der damit verbundenen Akkumulation in den Zellen ist GFP nicht für Untersuchungen geeignet, die darauf zielen transkriptionale Veränderungen in „Echtzeit“ („real time“) sichtbar zu machen. Ein weiterer kritischer Aspekt von GFP-basierten Reportersystemen liegt in der auftretenden Hintergrundfluoreszenz der zu untersuchenden Zellsysteme, die zu einem verringerten Signalrauschverhältnis („signal to noise ratio“) führt (Billinton und Knight, 2001). Im Allgemeinen muss die GFP-Konzentration hoch genug sein, um die Eigenfluoreszenz der Zellen zu übertreffen. Die fehlende enzymatische Amplifizierung des Signals bei GFP führt zu einer eingeschränkten Sensitivität, sodass Konzentrationen von ca. 1  $\mu\text{M}$  GFP im Cytoplasma notwendig sind, um eine Unterscheidung des GFP-Signals von zellulärer Hintergrundfluoreszenz zu ermöglichen (Niswender et al., 1995).

### 4.3.3.2 Luciferase

Das Enzym Luciferase (EC 1.13.12.7) stammt aus dem nordamerikanischen Leuchtkäfer (engl. firefly) *Photinus pyralis* und gehört seit der Klonierung des zugehörigen *luc* Gens (De Wet et al., 1987) zu den gängigsten Reportersystemen der Zell- und Molekularbiologie. Das monomere 61 kDa große Luciferase-Protein katalysiert die Oxidation des Substrats Luciferin, einem Benzothiazolyl-thiazol-Derivat, in Gegenwart von ATP, Sauerstoff und  $Mg^{2+}$  zu Oxyluciferin. Dabei werden Kohlendioxid und sichtbares Licht freigesetzt (Abb. 11) (De Wet et al., 1987 ; Promega Technical Bulletin No. 281).



**Abb. 11:** Durch Luciferase katalysierte Biolumineszenz-Reaktion

In Gegenwart eines Überschusses an Substrat ist die Lichtemission proportional zur Luciferaseaktivität im Zelllysate, welche wiederum die Transkription des Luciferase-reportergens und der damit verbundenen regulatorischen Sequenzen widerspiegelt. Die Lichtemission mit einem Maximum bei 560 nm setzt unmittelbar nach Substratzugabe ein und klingt sehr schnell wieder ab. Schon nach einer Minute verbleiben nur noch etwa 10 % der Spitzenaktivität (De Wet et al., 1987). Die Lichtsignale können mit einem Luminometer detektiert werden, das vorzugsweise eine Einrichtung zur Autoinjektion der Substratlösung besitzt. Alternativ kann das Lichtsignal auch mittels eines Flüssigszintillationszählers aufgenommen werden.

Kommerziell erhältliche Luciferase-Assays enthalten neben dem Substrat zusätzlich Coenzym A (CoA), um eine verbesserte Kinetik der Reaktion zu erreichen. Anstatt des normalerweise entstehenden Intermediats Luciferyl-AMP läuft die Reaktion nach Zugabe von Coenzym A über das Intermediat Luciferyl-CoA, wodurch ein Lichtsignal erreicht wird, das über einen Zeitraum von 60 Sekunden stabil bleibt. Durch das länger anhaltende Lichtsignal lässt sich die Lumineszenzintensität um das Zehnfache steigern,

was wiederum die Empfindlichkeit des Luciferase-Assays erhöht (Current Protocols in Molecular Biology, 2003; Wood, 1991).

Die Vorteile von Luciferase als Reportersystem liegen vorwiegend in der hohen Empfindlichkeit der Methode, verbunden mit einer breiten Linearität über sieben bis acht Größenordnungen (Promega Technical Bulletin No. 281; Alam und Cook, 1990; Wood, 1991). Die relativ einfache Durchführung und Schnelligkeit der Bestimmung sowie eine fehlende endogene Luciferaseaktivität in Säugerzellen machen die Firefly Luciferase zu einem der wichtigsten Reportersysteme.

**Tab. 6:** Übersicht zu Vor- und Nachteilen von GFP- und Luciferase-Assays

Reporterprotein	Vorteile	Nachteile
Firefly Luciferase	✦ hohe Empfindlichkeit	✦ Substratzugabe ist notwendig
	✦ breiter linearer Messbereich	✦ benötigt aerobe Bedingungen und ATP
	✦ keine endogene Aktivität in Säugerzellen	✦ relativ labiles Enzym (kurze Halbwertszeit)
GFP	✦ keine Substratzugabe	✦ moderate Empfindlichkeit
	✦ Mutanten mit veränderten Eigenschaften	(relativ hohes Detektionslimit, da keine Amplifikation des Signals)
	✦ keine endogene Aktivität in Säugerzellen	✦ posttranslationale Modifikation notwendig
	✦ stabil bei physiologischem pH	✦ Störungen durch Hintergrundfluoreszenz möglich
	✦ einfache Durchführung	
	✦ Messung auch <i>in vivo</i>	

Als nachteilig kann die Zugabe des externen Substrats Luciferin und die zur Reaktion notwendige Gegenwart von ATP und Sauerstoff gewertet werden. Auch ist Luciferase gegenüber dem proteolytischen Abbau in den Zellen nur wenig stabil, die Halbwertszeit in transfizierten Säugerzellen beträgt nur ungefähr drei Stunden (Thompson et al., 1991). Bisherige Luciferase-Assay-Systeme erforderten zur Messung der Luciferaseaktivität die Lyse der zu untersuchenden Zellen. Inzwischen sind auch Luciferase-Assays entwickelt worden, die mit membrangängigen Luciferin-Substraten arbeiten und so eine Quantifizierung auch *in vivo* erlauben.

## 4.4 Reportergenplasmide

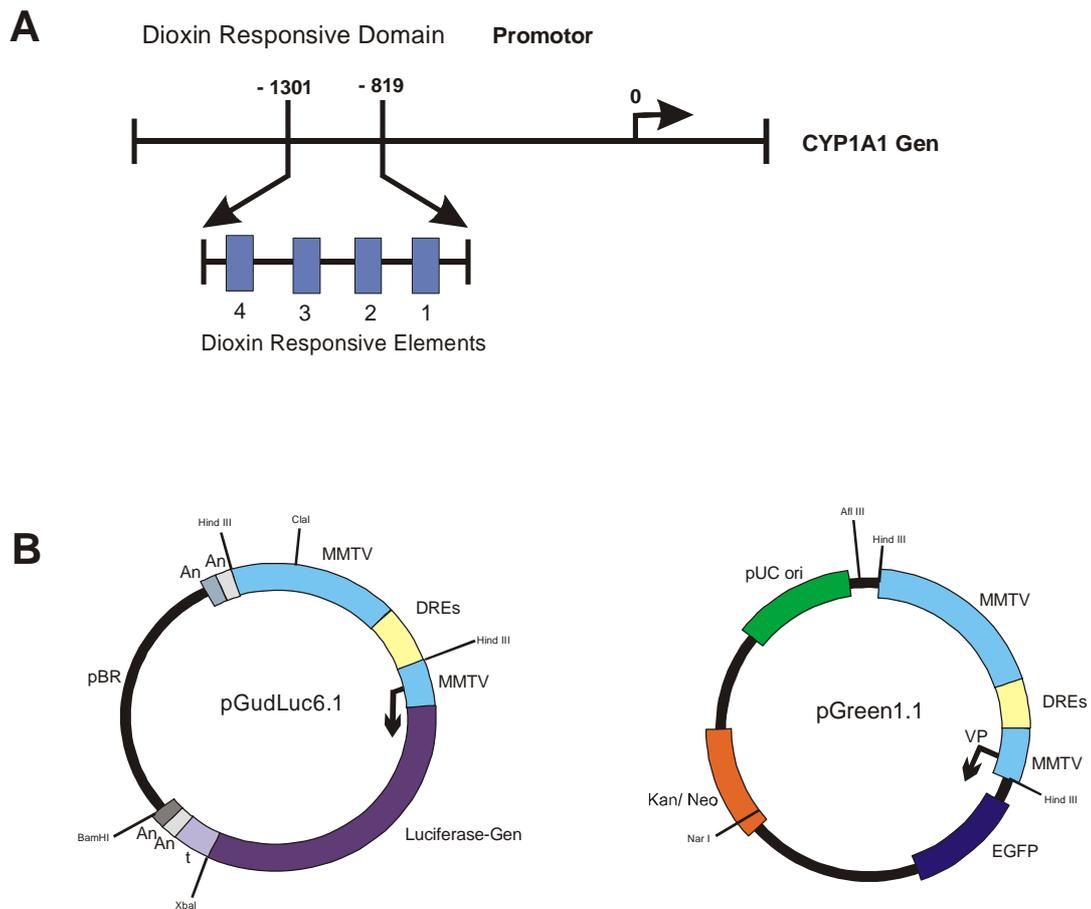
Die DNA-Konstrukte, die Reportergene enthalten, werden Reportergenvektoren genannt und besitzen einen ähnlichen strukturellen Aufbau. Das Rückgrat des Vektors besteht in der Regel aus von pBR322 oder pUC abgeleiteten bakteriellen Plasmiden. Es enthält typischerweise den Replikationsursprung einer Bakteriophage (*ϕI ori*), der die Synthese von Einzelstrang-DNA für Sequenzierungen und Mutagenesestudien ermöglicht sowie einen bakteriellen Replikationsursprung (*bacterial ori*), der für die Propagation (Vermehrung) des Vektors im bakteriellen Wirtsorganismus notwendig ist. Daneben wird die Vermehrung und Selektion des Vektors in Bakterien durch ein Antibiotika-Resistenzgen erleichtert, das in den meisten Fällen für  $\beta$ -Lactamase kodiert und den mit dem Vektor transformierten Bakterien eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin verleiht. Als weiteres Merkmal weisen die Vektoren stromabwärts des Reportergens liegend ein eukaryontisches Polyadenylationssignal (An) und Intronsequenzen (t) auf, welche die korrekte und effiziente Verarbeitung und Stabilität des Reportertranskripts in eukaryontischen Zellen sicherstellen sollen. Eine zweite Polyadenylationsstelle (An) kann sich stromaufwärts des Reportergens befinden, um unerwünschte RNA-Transkriptionsvorgänge, so genannte „read through“ Artefakte zu terminieren. Zusätzlich besitzen die Vektoren stromaufwärts des Reportergens eine multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site, MCS), die das Einfügen von fremder DNA, z. B. von Promotor- oder Enhancer-Elementen, erlaubt. Die MCS enthält typischerweise fünf bis sieben Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen, die jeweils nur einmal vorkommen und so das Einfügen der zu untersuchenden Gensequenzen ermöglichen (Current Protocols in Molecular Biology, 2003; Alam und Cook, 1990, Clemons und Zacharewski, 1999). Nach erfolgter Konstruktion des Reportergenvektors wird dieser zur Vermehrung in einen Wirtsorganismus, vorwiegend *E.coli*, eingeführt. Die Selektion der Bakterien, die den Vektor tragen, erfolgt mittels der Antibiotika-Resistenz, die dieser Vektor den Bakterien verleiht. Nach „Ernte“ der entsprechenden Bakterien und Isolierung der Reportergenplasmide werden diese in die gewünschten Säugetierzellen integriert (Transfektion).

#### 4.4.1 Reporterplasmide pGudLuc6.1 und pGreen1.1

Die in dieser Arbeit eingesetzten Reporterassays beruhen auf den Reporterplasmiden pGudLuc6.1 und pGreen1.1, die in Abbildung 12 dargestellt sind. Der Zugang zu den Plasmiden und den damit stabil transfizierten Zelllinien wurde uns durch die Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. M. Denison (UC Davis, USA) ermöglicht.

Der Vektor pGudLuc6.1 enthält ein modifiziertes Reporterogen der Firefly-Luciferase, während der zweite Vektor pGreen1.1 das EGFP-Reporterprotein („Enhanced green fluorescent protein“) trägt. Beide Vektoren stehen jeweils unter Kontrolle von vier AhR-abhängigen „Dioxin Responsive Elements“ (DREs) und wurden im Labor von Prof. M. Denison (UC Davis, USA) stabil in Mausleberzellen der Zelllinie Hepa1c1c7 transfiziert (Rushing und Denison, 2002; Nagy et al., 2002; Han et al., 2004).

Die 480 bp lange Sequenz der DREs stammt aus der stromaufwärts gelegenen regulatorischen Sequenz (Dioxin Responsive Domäne) des *CYP1A1* Gens der Maus und wurde stromaufwärts des „Mouse mammary tumor virus“ (MMTV) Promotors in die modifizierte „mouse mammary tumor virus long terminal repeat“ Sequenz eingefügt. Das DRE-MMTV Fragment wurde in den Promega Plasmiden pGL3-base bzw. den Clontech Plasmiden pEGFP-1 eingesetzt und die so erhaltenen Reporterplasmide pGudLuc6.1 bzw. pGreen1.1 benannt. Die Transfektion der Reporterplasmide in Maushepatomazellen (Hepa1c1c7) lieferte die Klone H1L6.1c2 (die den Plasmiden pGudLuc6.1 tragen) und H1G1.1c3 (die den Plasmiden pGreen1.1 tragen) (Rushing und Denison, 2002; Nagy et al., 2002; Han et al., 2004). Die DREs dienen als Bindungsstellen für den AhR-Arnt-Ligand-Komplex und übertragen das Ansprechen auf PCDDs und verwandte Verbindungen auf den MMTV Promotor, sodass die Expression des entsprechenden Reporterproteins induziert werden kann.



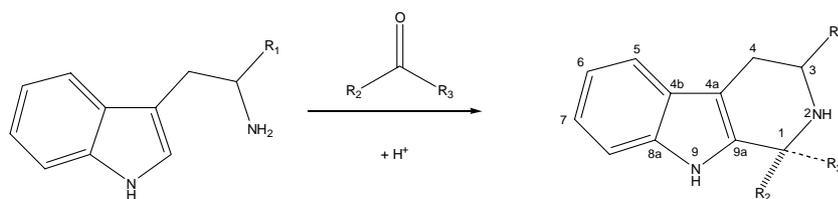
**Abb. 12:** (A) Übersicht der aus dem CYP1A1-Gen der Maus stammenden „Dioxin Responsive Elements“ (DREs); (B) Aufbau der Expressionsvektoren pGudLuc6.1 und pGreen1.1 (Der Transkriptionsstart wird jeweils durch den Pfeil gekennzeichnet, für die Erklärung der weiteren Bezeichnungen wird auf Abschnitt B 4.4 zum allgemeinen Aufbau von Plasmiden verwiesen).

## 5 $\beta$ -Carboline

### 5.1 Einleitung

Die Klasse der  $\beta$ -Carboline und ihrer Derivate wurde für unsere Untersuchungen auf ihr mögliches AhR Ligandenpotential ausgewählt, da sie von der Aminosäure Tryptophan abgeleitet sind, die selbst als schwacher AhR Agonist identifiziert wurde, und weil das  $\beta$ -Carbolin-Grundgerüst eine strukturelle Ähnlichkeit zum prototypischen Liganden 2,3,7,8-Tetrachlorbenzo-*p*-dioxin (TCDD) aufweist.

$\beta$ -Carboline und 1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -carboline sind natürlich vorkommende bioaktive Indol-Alkaloide, deren Grundstruktur das trizyklische 9*H*-Pyrido[3,4-*b*]indol-Ringsystem ist. Die auch unter physiologischen Bedingungen ablaufende Bildung der  $\beta$ -Carboline erfolgt durch Pictet-Spengler-Kondensation von Indolaminen mit Carbonylverbindungen (Abb. 13) und sukzessiver Oxidation des Tetrahydro-pyridinrings über die jeweiligen Dihydro- $\beta$ -carboline zu den vollaromatischen  $\beta$ -Carbolin-alkaloiden (Bailey et al., 1993; Cox und Cook, 1995).



**Abb. 13:** Bildung der Tetrahydro- $\beta$ -carboline durch Pictet-Spengler-Kondensation

## 5.2 Vorkommen von $\beta$ -Carbolinen in Pflanzen und Lebensmitteln

$\beta$ -Carbolinalkaloide sind im Pflanzenreich weitverbreitet. Abgeleitet von ihrer erstmaligen Identifizierung in *Peganum harmala*, der im Bereich des östlichen Mittelmeers bis nach Nordindien heimischen Steppenraute, werden sie auch Harmala-Alkaloide genannt. Zahlreiche Pflanzen, die in der Volksheilkunde u. a. aufgrund ihrer sedativen, antispastischen und schmerzstillenden Eigenschaften eingesetzt werden, enthalten  $\beta$ -Carbolinalkaloide (Tsuchiya et al., 1999b). Daneben wurden  $\beta$ -Carboline auch als aktive Inhaltsstoffe in halluzinogenen Gewächsen identifiziert, die südamerikanische Naturvölker zu religiösen Zwecken verwenden (Hashimoto et al., 1988). Neben diesen medizinisch genutzten Pflanzen stellen Lebensmittel die wichtigste Quelle für  $\beta$ -Carbolinalkaloide dar.

Aus der Reaktion von Tryptamin und Formaldehyd bzw. Acetaldehyd hervorgehende 1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -carboline (THC) und 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline (MeTHC) sowie die entsprechenden 6-Hydroxy-Derivate aus analoger Reaktion von Serotonin wurden in vielen Lebensmittel detektiert. Signifikante Gehalte dieser Tetrahydro- $\beta$ -carboline traten in Würzsoßen, alkoholischen Getränken, Milchprodukten sowie in zahlreichen Früchten und Gemüsen, in Schokolade und in Fleischwaren auf (Beck et al., 1983; Gutsche und Herderich, 1997b und 1998; Tsuchiya et al., 1996a und 1996b; Herraiz, 2000a; Herraiz und Galisteo, 2003; Herraiz und Papavergou, 2004). Die höchsten Gehalte von über 50 mg/l wurden für 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolin in Sojasauce ermittelt (Tsuchiya et al., 1996b).

Ebenfalls gut untersucht sind die Gehalte der von Tryptophan abgeleiteten Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-3-carbonsäuren. Signifikante Konzentrationen an 1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-3-carbonsäure (THCC) und (*1S,3S*)- bzw. (*1R,3S*)-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolin-3-carbonsäure (MeTHCC) wurden in alkoholischen Getränken, wie Bier und Wein, in Essig und Sojasaucen, in Schokolade und Kakao sowie in Fleischprodukten nachgewiesen (Herraiz, 1996, 1998 und 2000a; Herraiz und Papavergou, 2004; Sen et al., 1995; Adachi et al., 2000). Auch Früchte bzw. daraus gewonnene Fruchtsäfte, wie Grapefruit, Orange, Banane und Kiwi, enthalten THCC und MeTHCC

(Herraiz, 1998 und 1999; Herraiz und Galisteo, 2003). Die höchsten Gehalte traten auch hier bei Sojasaucen mit bis zu 500 mg/l MeTHCC auf (Adachi et al., 2000; Sen et al., 1995).

Die von Tryptophan und  $\alpha$ -Ketosäuren abgeleiteten Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-dicarbonsäuren konnten ebenfalls in verschiedenen Lebensmittelproben nachgewiesen werden. Die diastereomeren 1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-1,3-dicarbonsäuren, deren 1-Methyl-Derivate, und die 1-(2-Carboxyethyl)-tetrahydro- $\beta$ -carbolin-3-carbonsäuren traten dabei in Konzentrationen von 10  $\mu$ g/l bis über 10 mg/l in Sojasaucen, Würzsaucen, alkoholischen Getränken, Hefeextrakten und Fruchtprodukten auf (Gutsche und Herderich, 1997a). In diesen Lebensmitteln gelang es Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe außerdem verschiedene *glyko*-1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-3-carbonsäuren zu identifizieren und zu quantifizieren, die durch Kondensation von Tryptophan mit Aldohexosen entstehen (Gutsche et al., 1999; Gutsche, 1999).

Tetrahydro- $\beta$ -carboline – insbesondere THC-1- und THC-3-carbonsäuren sowie THC-1,3-dicarbonsäuren – stellen effektive Vorläufer der  $\beta$ -Carbolinalkaloide dar, die durch schrittweise Decarboxylierungs- und Oxidationsreaktionen bei thermischer Belastung, Zutritt von Luftsauerstoff und durch Zugabe nitrosierender Agenzien entstehen (Bobitt und Willis, 1980; Herraiz, 2000b; Rönner et al., 2000; Gutsche, 1999; Diem et al., 2001).

Aus der Gruppe der aromatischen  $\beta$ -Carbolinderivate sind insbesondere Harman (1-Methyl- $\beta$ -carbolin) und Norharman ( $\beta$ -Carbolin) von Bedeutung. Sie stellen die am besten untersuchten Vertreter der aromatischen  $\beta$ -Carboline dar. Harman und Norharman treten vorwiegend bei (stark) erhitzten proteinreichen Lebensmitteln auf und werden häufig zusammen mit den mutagenen heterozyklischen aromatischen Aminen (heterocyclic amines, HCA) analysiert. Da sie nicht die 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolin (IQ)-Struktur der klassischen HCAs aufweisen, werden sie auch als Vertreter der nicht-IQ-typischen heterozyklischen aromatischen Amine bezeichnet („non-IQ-type HCA“). Die Bildung von Harman und Norharman bei starker Wärmebehandlung von Fleisch und Fisch wird auf die Pyrolyse von Aminosäuren und Proteinen zurückgeführt (Kleinbauer und Rabache, 1990). Daneben ist auch die bei Erhitzungsprozessen ablaufende Maillard-Reaktion an der Entstehung von  $\beta$ -Carbolin-

derivaten beteiligt. Bei Modellumsetzungen von Tryptophan mit Glucose, Xylose, Furfural und Methylfurfural identifizierten Knoch und Baltes (1992) über 300 Maillard-Produkte des Tryptophans, darunter  $\beta$ -Carboline wie Harman, Norharman, 1-Acetyl-, 1-Alkyl- und 1-Furyl- $\beta$ -carboline sowie die korrespondierenden Dihydro- und Tetrahydro- $\beta$ -carboline. Yaylayan und Forga (1991) zeigten, dass der Abbau des entsprechenden Amadori-Umlagerungsprodukts von Tryptophan zur Bildung der  $\beta$ -Carboline Harman und Norharman führt.

Beachtliche Gehalte an Harman und Norharman wurden in gebratenen und gegrillten Fleisch- und Fischwaren, in Fleischextrakten und in Würzsoßen sowie in alkoholischen Getränken, getrockneten Früchten, Essig und Kaffee nachgewiesen (vgl. Tab. 7). Daneben treten  $\beta$ -Carboline auch in Zigarettenrauch auf und tragen so zur Exposition des Menschen gegenüber Norharman und Harman bei.

Darüber hinaus wurden auch verschiedene von den Kohlenhydraten D-Glucose und D-Ribose abgeleitete *glyko*- $\beta$ -Carboline in Lebensmitteln wie Ketchup, Sojasauce, Essig sowie in Pflaumen- und Ananas-Saft nachgewiesen (Diem und Herderich, 2001a und 2001b; Diem, 2001).

**Tab. 7:** Vorkommen und Gehalte ( $\mu\text{g/l}$  bzw.  $\mu\text{g/kg}$ ) von Harman und Norharman in Lebensmitteln und Zigarettenrauch

Lebensmittel	Harman	Norharman	Literatur
Sojasoße	1558 $\pm$ 1550	294 $\pm$ 86	a
	130 bis 250	15 bis 71	b
Sake	590	67	b
Essig	110 $\pm$ 83	26 $\pm$ 13	a
	15 bis 730	2 bis 96	b
Ketchup	55 $\pm$ 36	58 $\pm$ 19	a
Tabasco	62 $\pm$ 26	21 $\pm$ 11	a
Bier	6 $\pm$ 3	5 $\pm$ 3	a
	6 bis 140	n. b.	c
Wein	6 $\pm$ 7	0.6 $\pm$ 0.2	a
	9	0.5	b
	1 bis 12	n. b.	c
Kuhmilch	0.5 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.08	a
Käse	11 $\pm$ 14	3 $\pm$ 1	a
Kaffee	19 $\pm$ 5	64 $\pm$ 11	a
	32 $\pm$ 6	125 $\pm$ 29	k
Kakao	162 $\pm$ 73	84 $\pm$ 39	a
Cashewnuss <sup>p</sup>	6 bis 12	4	e
Ananas <sup>p</sup>	4 bis 6	4 bis 7	e
Banane <sup>p</sup>	2 bis 7	2 bis 4	e
gebratenes Fleisch	1 bis 169	2 bis 795	f
	0,3 bis 8	0,3 bis 41	m
	2 bis 10	2 bis 13	n
gebratener Fisch	1 bis 130	2 bis 184	g
	3 bis 8	1 bis 41	o
Fleischextrakt	20 bis 200	100	h
	130 $\pm$ 17	74 $\pm$ 7	l
	377	94	f
Bouillonkonzentrat	3 bis 22	8 bis 22	i
Zigarettenrauch	360 bis 2240 <sup>q</sup>	900 bis 4240 <sup>q</sup>	f
	2100 bis 3000 <sup>r</sup>	4130 bis 8990 <sup>r</sup>	f
	1026 $\pm$ 39 <sup>q</sup>	2534 $\pm$ 140 <sup>q</sup>	d

n. b. nicht bestimmt; <sup>a</sup> Tsuchiya et al., 1996b; <sup>b</sup> Adachi et al., 2000; <sup>c</sup> Bosin und Faull, 1988; <sup>d</sup> Smith et al., 2004; <sup>e</sup> Tsuchiya et al., 1999a; <sup>f</sup> Totsuka et al., 1999; <sup>g</sup> Gross und Grüter, 1992; <sup>h</sup> Skog et al., 1998; <sup>i</sup> Solyakov et al., 1999; <sup>k</sup> Herraiz, 2002; <sup>l</sup> Pais et al., 1997; <sup>m</sup> Busquets et al., 2004; <sup>n</sup> Solyakov et al., 2002; <sup>o</sup> Herraiz, 2000b; <sup>p</sup> getrocknet; <sup>q</sup> ng im Hauptstromrauch einer Zigarette; <sup>r</sup> ng im Nebenstromrauch einer Zigarette

### 5.3 Vorkommen von $\beta$ -Carbolinen in Säugern

Neben den umfangreichen Untersuchungen zum Vorkommen von  $\beta$ -Carbolinen und Tetrahydro- $\beta$ -carbolinen in Lebensmitteln wurden diese ebenfalls in verschiedenen Körpergeweben, in Blut und in Urin von Säugern detektiert. Adachi und Mitarbeiter (2000) bestimmten die Ausscheidung von 1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-3-carbonsäure und 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolin-3-carbonsäure in menschlichem Urin und in Muttermilch. Daneben konnte 1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -carbolin und 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolin sowie geringe Mengen an Harman und Norharman in humanem Urin nachgewiesen werden (Tsuchiya et al., 1996a und 1996b; Ushiyama et al., 1995). Auch die  $\beta$ -Carbolinderivate  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylamid (Yuan und Manabe, 1996) und  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-ethylester (Braestrup et al., 1980) konnten in humanem Urin identifiziert werden.

Verschiedene  $\beta$ -Carbolinderivate wurden auch im Gehirn von Ratten (Barker et al., 1981; Fukushima et al., 1992; Tsuchiya et al., 1995), in menschlicher Cerebrospinalflüssigkeit (Bosin et al., 1989) und in menschlichen Gehirnen (Matsubara et al., 1993) detektiert. Für die  $\beta$ -Carboline Harman und Norharman wurde ihre Verteilung in verschiedenen Geweben wie Gehirn, Leber, Herz, Nieren und Plasma einer männlichen Wistar-Ratte untersucht. Die dabei ermittelten Gehalte lagen in den Geweben für Norharman im Bereich von 292 bis 891 pg/g und für Harman im Bereich 147 bis 1049 pg/g (Rommelspacher et al., 1994). Die im Blutplasma gesunder, nichtrauchender Probanden bestimmten Konzentrationen an Harman und Norharman sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

**Tab. 8:** Basale Plasmagehalte an Harman und Norharman bei Nichtrauchern

n	Harman (pg/ml)	Norharman (pg/ml)	Literatur
8		23,4 ± 13,0 Bereich: 1,7 – 47,0	a
18		Bereich: 8,4 - 21,8	b
18		17 ± 8	e
100	228		f
36	4,1 ± 9 Bereich: 0 - 51	4,9 ± 7,9 Bereich: 0 – 26,5	c
5	4,1 ± 2,6	9,5 ± 5,0	d
27	11,3 ± 8,7	18,6 ± 14,0	g

<sup>a</sup> Fekkes et al., 2001a; <sup>b</sup> Spijkerman et al., 2002; <sup>c</sup> Kuhn et al., 1995; <sup>d</sup> Rommelspacher et al., 2002; <sup>e</sup> Breyer-Pfaff et al., 1996; <sup>f</sup> Louis et al., 2002; <sup>g</sup> Stohler et al., 1993 ; n : Anzahl der Probanden

### 5.3.1 Endogene Bildung und Aufnahme über die Nahrung

Das Vorkommen der  $\beta$ -Carbolinderivate in Säugern wird sowohl mit der endogenen Bildung im Organismus als auch mit der exogenen Aufnahme über die Nahrung erklärt. Frühe Studien von Susilo und Rommelspacher (1987) belegten bereits die *in vivo* Bildung von  $\beta$ -Carbolinderivaten durch Kondensation von Indolaminen mit Carbonylverbindungen. Durch Applikation radioaktiv markierter Vorläuferverbindungen konnte die Bildung von 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolin-1-carbonsäure aus Tryptamin und Pyruvat im Gehirn von Ratten gezeigt werden. Auch die anschließende metabolische Transformation zu Harman, 1-Methyl-3,4-dihydro- und 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolin wurde beschrieben (Susilo et al., 1987). Die endogene Bildung von Norharmanderivaten, die an Position C1 unsubstituiert sind, erfolgt durch Zyklisierung von Tryptophan bzw. Tryptamin mit Formaldehyd als Carbonylkomponente, das bei der enzymatischen Umsetzung von 5-MeTHF zu THF freigesetzt wird (Hsu und Mandell, 1975). Darüber hinaus zeigten Fekkes und Mitarbeiter (2001b) durch Verabreichung von L-Tryptophan an Versuchspersonen und Messung der resultierenden Norharmangehalte, dass auch L-Tryptophan ein Vorläufer der endogenen Synthese von Norharman im Menschen ist.

Die tägliche endogene Produktion an  $\beta$ -Carbolinen wurde anhand der ermittelten Plasmagehalte und Halbwertszeiten für Norharman auf etwa 50 bis 100 ng/kg Körpergewicht und für Harman auf etwa 20 ng/kg Körpergewicht geschätzt (Pfau und Skog, 2004). Diese endogenen Carbolingehalte können jedoch durch die Aufnahme von Vorläufern, insbesondere durch die Aufnahme von Lebensmitteln, entscheidend verändert werden. So nahmen bei Verzicht auf Nahrung die Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Gehalte im Urin von Probanden erheblich ab (Tsuchiya et al., 1996a).

Die orale Bioverfügbarkeit von Harman und Norharman wurde anhand von Untersuchungen an Freiwilligen (Fekkes et al., 2001a) und mittels Tierstudien (Guan et al., 2001) auf weniger als 20 % abgeschätzt. Bei inhalativer Exposition zeigte sich jedoch eine effektive Aufnahme der  $\beta$ -Carboline, was sich in einem schnellen Anstieg der Plasmagehalte von Harman und Norharman beim Rauchen äußerte (Fekkes et al., 2001a; Rommelspacher et al., 2002). Abhängig von den individuellen Rauchgewohnheiten kann bei einem angenommenen Konsum von 20 Zigaretten die Aufnahme von Norharman bis zu 1,14  $\mu$ g/kg Körpergewicht und von Harman 0,57  $\mu$ g /kg Körpergewicht betragen (Pfau und Skog, 2004).

### 5.3.2 $\beta$ -Carboline als Biomarker

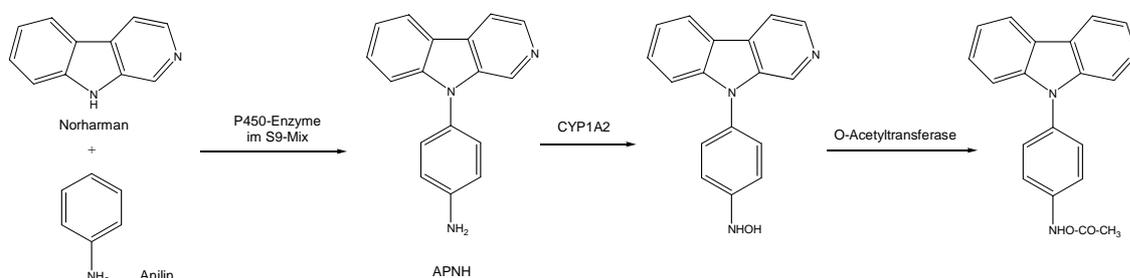
Daneben werden  $\beta$ -Carbolinderivate auch als Biomarker verschiedener Krankheiten diskutiert. Erhöhte Gehalte an 1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -carbolin (THC), 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolin (MeTHC), Harman und Norharman konnten in Plasma, Urin und Haaren bei Rauchern (Breyer-Pfaff et al., 1996; Spijkerman et al., 2002; Rommelspacher et al., 2002; Tsuchiya, 2004), bei Heroinabhängigen (Stohler et al., 1993) und in Folge von Alkoholgenuss (Tsuchiya et al., 1996c; Wodarz et al., 1996) detektiert werden. Diese Studien deuten somit auf eine mögliche Beteiligung von  $\beta$ -Carbolinen an Alkoholismus und Drogenabhängigkeit hin. Der Anstieg dieser Verbindungen wird dabei auf eine erhöhte exogene Zufuhr und / oder eine erhöhte endogene Produktion zurückgeführt.

## 5.4 Pharmakologische Wirkungen der $\beta$ -Carboline

In der Literatur ist für  $\beta$ -Carbolinalkaloide ein breites Spektrum an biochemischen und psychopharmakologischen Eigenschaften in Mensch und Tier beschrieben, wobei einzelne Vertreter sich in ihrem Wirkprofil unterscheiden können.

### 5.4.1 Genotoxizität

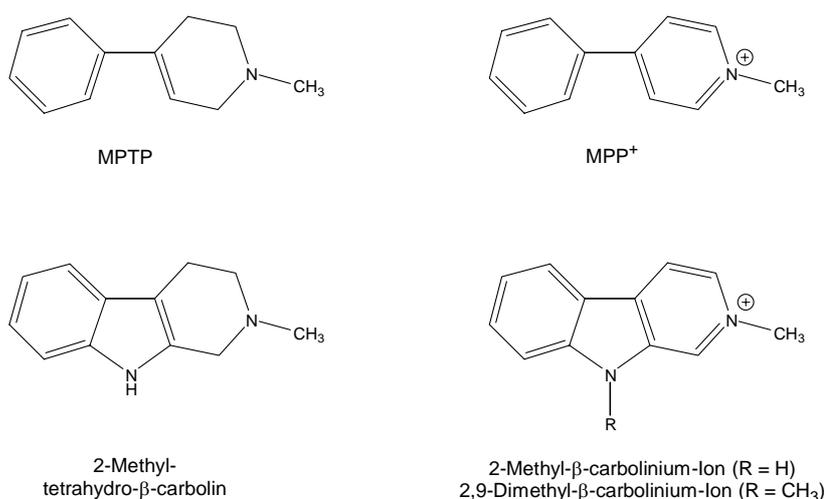
Aromatische  $\beta$ -Carboline wie Harman und Norharman besitzen genotoxische Eigenschaften. Dabei stellen sie keine Mutagene im eigentlichen Sinne dar, sondern beeinflussen als Comutagene die genotoxischen Wirkungen anderer Verbindungen. So weisen Mischungen von Norharman und dem nicht-mutagenen aromatischen Amin Anilin nach metabolischer Aktivierung durch S9-Mix ein starkes genotoxisches Potential auf. Die comutagenen Eigenschaften von Norharman werden dabei auf folgenden Mechanismus zurückgeführt: Die zunächst durch direkte Kopplung der Ausgangsstoffe entstehende Verbindung 9-(4'-Aminophenyl)-9*H*-pyrido[3,4-*b*]indol (Aminophenyl-norharman, APNH) wird in einem zweiten Schritt zum *N*-Hydroxyamino-Derivat metabolisch aktiviert. Durch den Einfluß einer O-Acetyltransferase entsteht der *N*-Acetoxy-Metabolit, der DNA-Addukte eingeht und somit das eigentliche Mutagen darstellt (Totsuka et al., 2004) (Abb. 14). Analoge Strukturen mit mutagenen Eigenschaften konnten auch aus der Reaktion von Norharman mit *o*- und *m*-Toluidin und von Harman mit den entsprechenden Aminen gewonnen werden (Hada et al., 2001).



**Abb. 14:** Schematik der Reaktion von Norharman mit Anilin in Gegenwart von S9-Mix (nach Totsuka et al., 2004)

### 5.4.2 Neurotoxizität

Das in synthetischem Heroin als Kontaminante auftretende Neurotoxin *N*-Methyl-4-phenyl-tetrahydropyridin (MPTP) wird *in vivo* zum *N*-Methyl-4-phenylpyridinium-Ion (MPP<sup>+</sup>) metabolisiert, das die Zerstörung von dopamin-produzierenden Neuronen im Gehirn induziert und Parkinson-ähnliche Symptome auslöst. Da MPTP und MPP<sup>+</sup> eine große strukturelle Ähnlichkeit zu 2-Methyl-tetrahydro- $\beta$ -carbolin und dem entsprechenden 2-Methyl- $\beta$ -carbolinium-Ion aufweisen (Abb. 15), werden diese  $\beta$ -Carbolinderivate als mögliche endogene Neurotoxine diskutiert. Im Gehirn von Säugern vorliegende  $\beta$ -Carboline und Tetrahydro- $\beta$ -carboline können durch *N*-Methylierung bioaktiviert und in die entsprechenden 2-Methyl- und 2,9-Dimethyl-derivate überführt werden (Matsubara et al., 1992). Diese Verbindungen, insbesondere die 2,9-di-*N*-methylierten  $\beta$ -Carboline zeigen funktionelle und neurotoxische Eigenschaften analog MPP<sup>+</sup> und konnten auch in menschlichen Gehirnproben detektiert werden (Matsubara et al., 1993). Signifikant erhöhte Konzentrationen an *N*-Methylcarbolinium-Ionen in der cerebrospinalen Flüssigkeit von Parkinson-Patienten (Matsubara et al., 1995) sowie neurotoxische Effekte nach *in vivo* Administration an Ratten (Matsubara et al., 1998) sprechen für eine Beteiligung der bioaktivierten, neurotoxischen *N*-methylierten  $\beta$ -Carbolinium-Ionen an der Pathogenese von Morbus Parkinson.



**Abb. 15:** Strukturelle Ähnlichkeit von MPTP und MPP<sup>+</sup> mit *N*-Methyl- $\beta$ -carbolinderivaten

Auch das chlorierte  $\beta$ -Carbolinderivat 1-Trichlormethyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolin (TaClo), das ebenfalls eine hohe strukturelle Analogie zum Neurotoxin *N*-Methyl-4-phenyl-tetrahydropyridin (MPTP) aufweist, wird als neurotoxisches Agens im Zusammenhang mit der Parkinson-Krankheit diskutiert (Riederer et al., 2002). Die Bildung von TaClo erfolgt im menschlichen Körper im Spurenbereich durch Pictet-Spengler-Kondensation aus dem biogenen Amin Tryptamin („Ta“) und dem therapeutisch eingesetzten Hypnotikum Trichloracetaldehyd (Chloral, „Clo“) (Bringmann et al., 1999 und 2002). TaClo zeigt in kultivierten neuronalen Zellkulturen toxische Effekte auf dopaminerge und serotoninerge Neuronen (Rausch et al., 1995; Bringmann et al., 2000). Im Rattenmodell wurden starke Beeinträchtigungen des Dopamin- und Serotoninmetabolismus durch TaClo beobachtet (Grote et al., 1995; Gerlach et al., 1998). Es wird angenommen, dass diese im Zusammenhang mit langsam fortschreitenden, neurodegenerativen Prozessen stehen, die im Rattenmodell zu einer Parkinson-ähnlichen, verminderten Bewegungsfähigkeit der Tiere führen (Heim und Sontag, 1997).

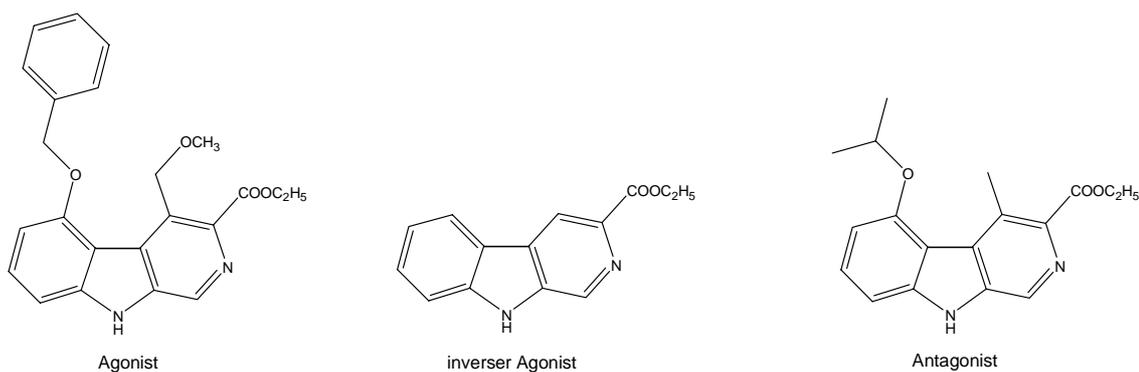
### 5.4.3 Wechselwirkungen mit dem zentralen Nervensystem

Ausgehend von den traditionellen medizinischen und halluzinogenen Anwendungen  $\beta$ -carbolinhaltiger Pflanzen war der mögliche Einfluss dieser Verbindungen auf das zentrale Nervensystem Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen. So konnten verschiedene  $\beta$ -Carboline als potente Inhibitoren der Monoaminoxidase-A-Aktivität (MAO A) identifiziert werden (Rommelspacher et al., 1994; Kim et al., 1997). Monoaminoxidasen sind Flavoproteine der äußeren mitochondrialen Membran und treten als Isoenzyme MAO-A und MAO-B auf. Ihre Hauptfunktion ist die Inaktivierung biogener Amine, wie Serotonin, Dopamin und Noradrenalin, die als Neurotransmitter und Gewebshormone fungieren. Durch Inhibierung der MAO können  $\beta$ -Carboline die Gehalte an Neurotransmittern und deren Metaboliten im zentralen Nervensystem modulieren und somit Verhaltensveränderungen induzieren (Baum et al., 1996; Iurlo et al., 2001).

Daneben wurde beschrieben, dass  $\beta$ -Carboline mit hoher Affinität an verschiedene Rezeptoren des Gehirns binden können. So werden für die durch Harmalin und Harmin

ausgelösten halluzinogenen Effekte deren Wechselwirkung mit dem 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptor (Serotonin-Rezeptor) verantwortlich gemacht (Grella et al., 2003). Verschiedene  $\beta$ -Carbolinderivate binden mit hoher Affinität an Imidazolin-Rezeptoren (Husbands et al., 2001), deren physiologische Rolle jedoch noch weitgehend ungeklärt ist.

Am wohl umfangreichsten untersucht sind die  $\beta$ -Carboline als Liganden des Benzodiazepin-Rezeptors. Benzodiazepine, wie das synthetische Diazepam, vermitteln ihre angstlösende, entkrampfende, beruhigende und muskelrelaxierende Wirkung durch Bindung an den Benzodiazepin-Rezeptor im Gehirn. Braestrup und Mitarbeiter (1980) konnten  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester als ersten hoch-affinen Benzodiazepin-Rezeptor-Liganden aus der Klasse der  $\beta$ -Carbolinderivate identifizieren. In der Folge wurden weitere  $\beta$ -Carboline als nicht-benzodiazepinartige Liganden des Benzodiazepin-Rezeptors identifiziert (Ferretti et al., 2004; Rommelspacher et al., 1985). Die strukturellen Eigenschaften beeinflussen dabei neben der Affinität zum Rezeptor auch das Wirkprofil einzelner  $\beta$ -Carboline. Diese können als Agonisten, die Benzodiazepin-typische Effekte auslösen, als inverse Agonisten mit entgegengesetzter Wirkung und als Antagonisten, die die Wirkung der Benzodiazepine aufheben, fungieren (Abb. 16; Cooper, 1987).



**Abb. 16:**  $\beta$ -Carbolinderivate mit unterschiedlichem Wirkprofil als Liganden des Benzodiazepin-Rezeptors (Cooper, 1987)



# C Ergebnisse und Diskussion

## 1 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, natürliche Liganden des Ah Rezeptors (AhR) zu identifizieren und zu charakterisieren. Im Mittelpunkt unserer Untersuchungen stand dabei die Klasse der  $\beta$ -Carboline und ihrer Derivate, deren natürliches Vorkommen bereits in zahlreichen Lebensmitteln und im menschlichen Organismus gezeigt werden konnte (vgl. Abschnitt B 5). Es wurde angenommen, dass die  $\beta$ -Carboline Liganden des Ah Rezeptors darstellen, da sie eine strukturelle Ähnlichkeit zum prototypischen AhR Agonisten 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) aufweisen und von der Aminosäure Tryptophan abgeleitet sind, die selbst als schwacher AhR Agonist identifiziert wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit galt es zunächst die beiden rekombinanten, zellbasierten EGFP- und Luciferase-Reporterassays (vgl. Abschnitt B 4.3 und 4.4) in unserer Arbeitsgruppe zu etablieren. In Screeningstudien sollten  $\beta$ -Carboline und Derivate mittels dieser funktionellen Reporterassays auf ihr AhR Ligandenpotential untersucht und Verbindungen mit AhR Ligandenaktivität identifiziert werden. Daran anschließend sollte die Fähigkeit der in den Screeningstudien „aktiven“  $\beta$ -Carboline als AhR Liganden zu wirken, insbesondere deren agonistische und antagonistische Wirkpotentiale, umfassend charakterisiert werden. Dazu sollten sowohl die beiden funktionellen Reporterassays, als auch *in vivo* und *in vitro* DNA-Bindungsassays eingesetzt werden. Ziel der abschließenden Screeningstudien von Soja- und Würzsoßen war es dann, mit Hilfe der funktionellen Reporterassays, Bedeutung und Einfluss von komplexen AhR Ligandmischungen in realen Lebensmitteln auf die AhR vermittelte Genexpression zu bestimmen.

## 2 Etablierung der funktionellen Reporterassays

Neben der klassischen Analytik mittels HR-GC-MS stellen Bioassays, die auf dem AhR-abhängigen Signaltransduktionsweg basieren, die Methode der Wahl zur Identifizierung, Charakterisierung und relativen Quantifizierung von Umweltkontaminanten und natürlich vorkommenden Verbindungen mit AhR Ligandenpotential dar (vgl. Abschnitt B 4).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei rekombinante, zellbasierte Bioassays eingesetzt, um natürliche Lebensmittelinhaltsstoffe auf ihre Wirkung als AhR Liganden zu untersuchen. Dabei handelte es sich um die von der Mausleberzelllinie Hepa1c1c7 abgeleiteten Klone H1L6.1c2 und H1G1.1c3. Diese wurden durch stabile Transfektion der Reporterplasmide pGudLuc6.1 bzw. pGreen1.1 erhalten, die jeweils unter der Kontrolle von vier „dioxin responsive elements“ (DREs) stehen (vgl. Abschnitt B 4.4.1).

Diese beiden AhR-kontrollierten Reporterassays wurden am Lehrstuhl für Environmental Toxicology der University of California, Davis, USA von Herrn Prof. M.S. Denison entwickelt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Zur Etablierung der beiden Bioassays mit GFP- bzw. Luciferase-Reporterassay in unserer Arbeitsgruppe wurde die Funktionsfähigkeit der Assays mittels der aus der Literatur bekannten AhR Liganden 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) und  $\beta$ -Naphthoflavon (BNF) als weniger toxische Referenzsubstanz demonstriert. Die Validierung beider Testsysteme erfolgte anhand der für diese klassischen Agonisten charakteristischen Dosis-Wirkungskurven und EC<sub>50</sub>-Werte. Daneben wurden die Durchführung beider Reporterassays auch hinsichtlich unserer Laborausstattung standardisiert.

## 2.1 EGFP-Assay

### 2.1.1 Basale und induzierbare EGFP-Gehalte

Zur Einführung des EGFP-Testsystems wurden zunächst die basalen und die durch  $\beta$ -Naphthoflavon (BNF) induzierbaren Gehalte an EGFP in den Zellen untersucht. Dazu wurden H1G1.1c3 Zellen auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte für 24 Stunden mit Medium, mit 1 % DMSO bzw. mit 1  $\mu$ M ( $\mu$ mol/l) BNF bei 33 °C inkubiert (vgl. Tab. 9). Die Fluoreszenzmessung erfolgte dabei von unten durch den durchsichtigen Boden der verwendeten schwarzen Mikrotiterplatten ohne Entfernung des Mediums. Zu Vergleichszwecken wurde auch Medium bzw. in Medium gelöstes BNF ohne Zellen unter diesen Bedingungen vermessen.

**Tab. 9:** Vergleich der Fluoreszenzaktivität von behandelten bzw. unbehandelten H1G1.1c3 Zellen, von Medium und von in Medium gelöstem BNF

Behandlung der H1G1.1c3 Zellen	Fluoreszenzaktivität <sup>a</sup>	Relative Induktion <sup>b</sup>	Korrigierte Fluoreszenz <sup>c</sup>	Relative Induktion
Medium	29760 $\pm$ 439			
DMSO 1 %	31758 $\pm$ 685		1998 $\pm$ 685	
BNF 1 $\mu$ M	61508 $\pm$ 965	2	31748 $\pm$ 965	16
Medium ohne Zellen	25419 $\pm$ 626			
BNF 1 $\mu$ M ohne Zellen	25933 $\pm$ 668			

a: Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei Bestimmungen

b: Daten repräsentieren die Induktion der Fluoreszenz in der Probe gegenüber DMSO

c: Daten repräsentieren die Fluoreszenzaktivität nach Subtraktion der Fluoreszenz der mit Medium behandelten Proben

Die Behandlung der Zellen resultierte im Fall von BNF in einer 2-fach stärkeren Induktion der EGFP-Fluoreszenz gegenüber den mit DMSO behandelten Zellen. Die Daten zeigten, dass die Zunahme der Fluoreszenz auf die Induktion der EGFP-Expression durch den AhR Agonisten BNF zurückzuführen ist, da BNF unter diesen Bedingungen selbst keine Eigenfluoreszenz aufweist. Daneben wurde auch ersichtlich, dass die bei den nur mit Medium behandelten Zellen gemessene Hintergrundfluoreszenz

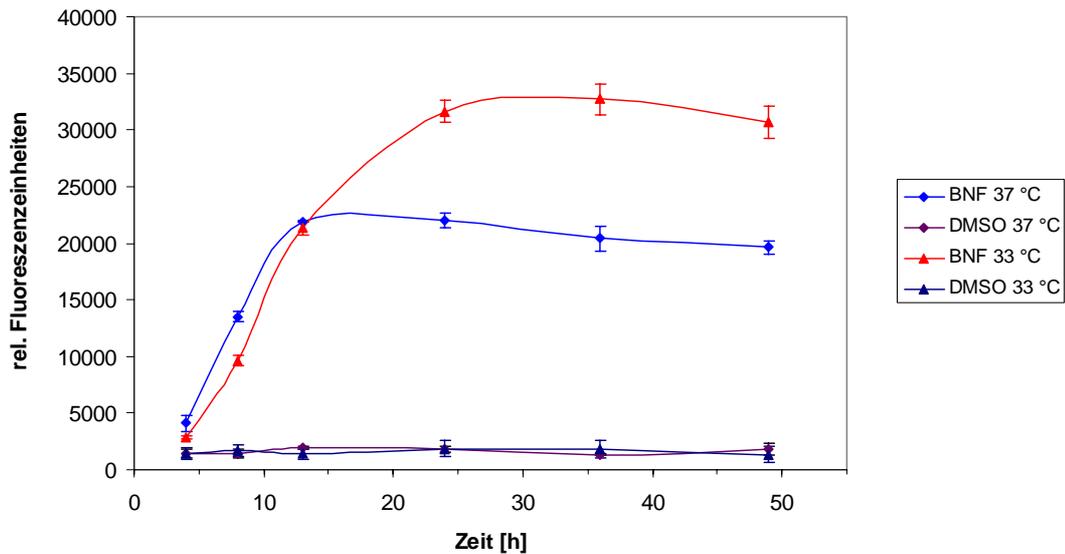
zu ungefähr 85 % aus dem Zellkulturmedium stammt, während die Zellen selbst nur einen geringen Beitrag zur Hintergrundfluoreszenz leisteten.

Durch Subtraktion der vom Medium ausgehenden Hintergrundfluoreszenz von der gemessenen Fluoreszenzaktivität der BNF Probe wird deutlich, dass die Behandlung der H1G1.1c3 Zellen mit BNF in einer 16-fachen Zunahme der EGFP-Fluoreszenz resultierte. In allen folgenden Experimenten wurde die Hintergrundfluoreszenz von Wells, die nur mit Medium behandelt waren, von den Fluoreszenzmesswerten der Proben subtrahiert, um eine korrekte Bewertung der EGFP-Aktivität zu ermöglichen.

### **2.1.2 Optimierung der Inkubationstemperatur und zeitlicher Verlauf der EGFP-Expression**

Das EGFP-Reportergen der H1G1.1c3 Zelllinie ist für die Expression in Säugerzelllinien optimiert, welche gewöhnlicherweise bei 37 °C kultiviert werden. Die Ausbildung des EGFP-Chromophors ist jedoch ein temperaturabhängiger Prozess, wobei in der Literatur beschrieben ist, dass bei Säugerzellen eine höhere Fluoreszenz erreicht wird, wenn diese bei 30 – 33 °C wachsen (Clontech Living Colors® User Manual). Zur Prüfung der Temperaturabhängigkeit der EGFP-Bildung und Optimierung möglicher Inkubationstemperaturen wurden die H1G1.1c3 Zellen bei 33 °C und bei 37 °C mit 1 µM BNF bzw. mit 1 % DMSO inkubiert (Abb. 17).

Abbildung 17 zeigt, dass nach ca. 20 Stunden die Induktion der EGFP-Aktivität in den bei 33 °C inkubierten Zellen signifikant höher war als die der 37 °C-Zellen. Dies lässt sich auf eine geringere EGFP-Bildung bei 37 °C zurückführen. Hingegen traten bei den mit DMSO behandelten Kontrollzellen keine signifikanten Unterschiede in der Fluoreszenzaktivität auf. Für alle weiteren Screeningexperimente wurde daher die Inkubation der Zellen mit Testsubstanzen bei 33 °C durchgeführt, um eine maximale EGFP-Expression und somit auch maximale Fluoreszenzgehalte zu erhalten. Zur Kultivierung der H1G1.1c3 Zelllinie wurde die für die Proliferation von Säugerzellen optimale Temperatur von 37 °C beibehalten.



**Abb. 17:** Zeitlicher Verlauf der EGFP-Induktion durch BNF in H1G1.1c3 Zellen bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen. Nach Behandlung der Zellen mit 1  $\mu$ M BNF bzw. 1 % DMSO wurden die Zellen bei 33 °C und bei 37 °C für die angegebenen Zeitintervalle inkubiert. Die aufgeführten Fluoreszenzwerte repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei Bestimmungen. Bei beiden Temperaturen ist ab einer Inkubationszeit von 4 Stunden die durch BNF induzierte EGFP-Fluoreszenz signifikant höher als die der DMSO-Kontrollprobe (Student's t-Test,  $p < 0,05$ ).

Da die EGFP-Fluoreszenz zerstörungsfrei in intakten Zellen gemessen werden kann, ließ sich auch der zeitliche Verlauf der EGFP-Expression leicht verfolgen. Dazu wurden die Mikrotiterplatten nach beendeter Messung zurück in den Inkubator verbracht und zu den entsprechenden Zeitpunkten erneut vermessen. Der so bestimmte zeitliche EGFP-Expressionsverlauf ist ebenfalls in Abbildung 17 dargestellt. Nach einer kurzen Verzögerungsphase (Lag-Phase) im Bereich von 0 bis 4 Stunden kam es ab etwa 6 Stunden zu einem starken, fast linearen Anstieg der gemessenen Fluoreszenzwerte. Dieser Anstieg erfolgte bis ca. 36 Stunden nach Inkubationsbeginn. Daran anschließend kam es durch den Abbau des EGFP-Proteins in den Zellen (Halbwertszeit ca. 24 Stunden) zum langsamen Abklingen der Fluoreszenzaktivität. Aus Gründen der Praktikabilität wurde daher für alle Studien mit dem EGFP-Reporterassay eine Inkubationsdauer von 24 Stunden gewählt.

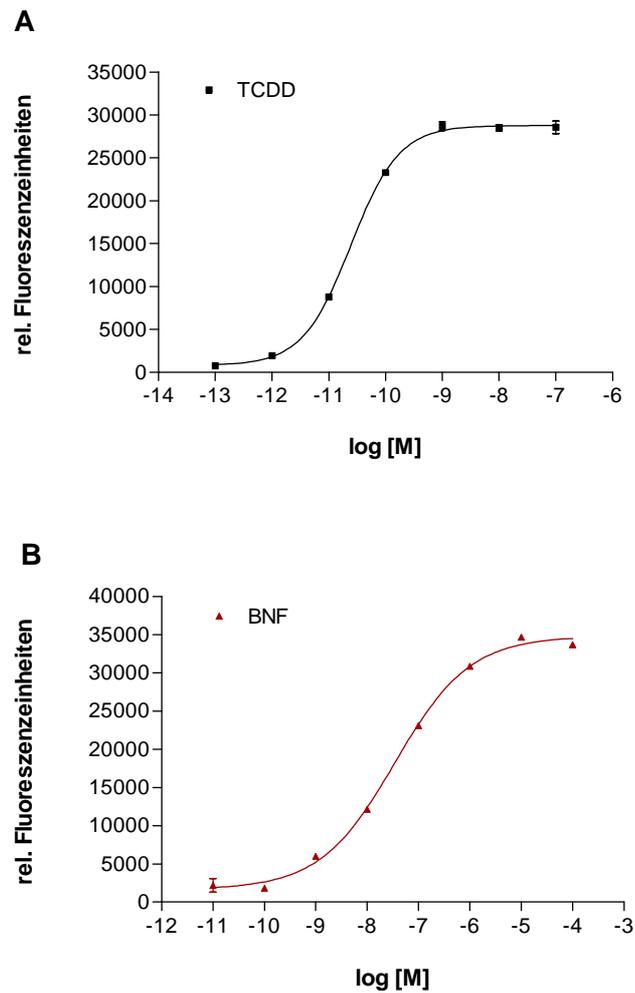
### 2.1.3 Charakterisierung des Ansprechens der H1G1.1c3 Zellen auf AhR Agonisten

Zur weiteren Validierung und Prüfung der Funktionsfähigkeit des EGFP-Bioassays wurde das „Ansprechen“ der H1G1.1c3-Zellen auf die bekannten AhR Agonisten TCDD und BNF mittels Dosis-Wirkungsuntersuchungen charakterisiert. Zur Ermittlung dieser Dosis-Wirkungsbeziehungen wurden die Zellen mit unterschiedlichen Agonist-Konzentrationen bei 33 °C für 24 Stunden inkubiert und anschließend die Fluoreszenzaktivitäten gemessen.

Zur Evaluation der Ergebnisse von Dosis-Wirkungsbeziehungen wurde die ausgelöste biologische Wirkung (hier: die induzierte Fluoreszenzaktivität von EGFP) gegen den Logarithmus der Dosis aufgetragen. Es zeigte sich, dass die Konzentration an TCDD bzw. BNF in der Probe mit dem Ausmaß der Reporterexpression korrelierte. Für die Dosis-Wirkungsbeziehung der AhR-abhängigen Expression des EGFP-Reportergens ergab sich, wie für die meisten pharmakologischen und toxikologischen Wirkungen, ein sigmoider Kurvenverlauf (Abb. 18), der sich mathematisch durch folgenden Term beschreiben lässt:

$$Y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + 10^{(\log EC_{50} - X) \cdot S}} \quad \text{„Variable slope sigmoidal equation“}$$

Y:	hervorgerufene biologische Wirkung
X:	Logarithmus (log) der Konzentration
Bottom:	unteres Plateau (nicht aktivierter Rezeptor)
Top:	oberes Plateau (Sättigungsbereich des Rezeptors)
S:	Steilheit (slope) des Übergangs vom unteren zum oberen Plateau
EC <sub>50</sub> :	Konzentration bei 50%iger Wirkung (50 % von Y), Wendepunkt der Kurve



**Abb. 18:** Dosis-Wirkungsbeziehung für die EGFP-Induktion durch TCDD (A) und BNF (B). Die H1G1.1c3 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an TCDD bzw. BNF für 24 h bei 33 °C inkubiert und die EGFP-Fluoreszenz ohne Entfernung des Mediums vermessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei Bestimmungen. Die Fluoreszenzwerte bei  $10^{-12}$  M TCDD bzw.  $10^{-9}$  M BNF waren signifikant größer als die der mitgeführten DMSO-Kontrolle (Student's t-Test,  $p < 0,05$ ).

Aus den Dosis-Wirkungskurven lässt sich auch die Empfindlichkeit des Assays sowie der abgedeckte dynamische Konzentrationsbereich für die entsprechende biologische Wirkung ablesen.

Die Experimente zur Dosis-Wirkungsbeziehung ergaben für die EGFP-Expression durch TCDD ein minimales Detektionslimit (MDL, minimal detection limit) von

ca. 1 pM, einen  $EC_{50}$ -Wert von 25 pM, und eine maximale Induktion im Bereich von  $10^{-9}$  bis  $10^{-7}$  M (Abb. 18 A). Für BNF wurde ein minimales Detektionslimit von  $10^{-9}$  M, ein  $EC_{50}$ -Wert von 35 nM und eine maximale Induktion bei ca. 10  $\mu$ M ermittelt (Abb. 18 B). Die AhR Agonisten TCDD und BNF zeigten somit im EGFP-Assay einen klassischen, dosis-abhängigen Effekt mit sigmoidem Kurvenverlauf.

Es sei darauf hingewiesen, dass die Unterschiede der durch TCDD und BNF erreichten maximalen Fluoreszenzniveaus (obere Plateaus) (Abb. 18) nicht auf die Liganden, sondern auf die Verwendung zweier verschiedener Fluorometer zur Messung zurückzuführen waren. Diese unterschieden sich hinsichtlich ihrer maximal messbaren Fluoreszenzwerte und der zu wählenden Signalverstärkung (Gain). Für beiden Geräte wurden die optimalen Einstellungen zur Messung angewandt.

#### 2.1.4 Reproduzierbarkeit des EGFP-Assays

Die Reproduzierbarkeit des EGFP-Assays wurde untersucht, indem die durch 1  $\mu$ M BNF induzierten EGFP-Fluoreszenzaktivitäten bei drei aufeinanderfolgenden Assays (im Abstand von drei bzw. sechs Tagen) verglichen wurden. Die dabei ermittelten Fluoreszenzwerte, ausgedrückt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, waren  $34345 \pm 1720$ ,  $30734 \pm 1430$  und  $30960 \pm 1747$ . Die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA-Test, Signifikanzniveau  $\alpha$ : 0,01) der drei unabhängig voneinander durchgeführten Ansätze zeigte, dass zwischen den Mittelwerten der Messungen keine signifikanten Unterschiede bestehen. Die Ähnlichkeit der Ergebnisse dieser drei Messungen belegt somit die hohe Reproduzierbarkeit des verwendeten EGFP-Assays.

Neben der Ligand-Konzentration in der Probe stellten Zellzahl pro Well und gewählte Messbedingungen, wie Gain (Signalverstärkung) und Geometrie der Messeinrichtung („Bottom-Messung“), weitere mögliche Einflussfaktoren für die zu messenden Fluoreszenzwerte dar. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit des EGFP-Assays zeigten, dass diese Faktoren durch das von uns gewählte Standardprotokoll konstant gehalten werden konnten. Die absoluten Standardabweichungen der Triplikat-Bestimmungen von  $\beta$ -Naphthoflavon innerhalb eines Ansatzes von typischerweise 5 %, wie z. B. in Abbildungen 17 und 18 eingezeichnet, belegen ebenfalls die hohe Verlässlichkeit der Methode.

## 2.2 Luciferase-Assay

### 2.2.1 Basale und induzierbare Luciferase-Gehalte

Zur Prüfung der Funktionsfähigkeit und zur Validierung des Luciferase-Reporterassays in unserer Arbeitsgruppe wurden die basale und die durch den bekannten AhR Agonisten  $\beta$ -Naphthoflavon (BNF) induzierbare Luciferaseaktivität in H1L6.1c2 Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen gemäß dem Standardprotokoll für 4 Stunden mit Medium, mit 1 % DMSO bzw. mit 1  $\mu$ M BNF bei 37 °C inkubiert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Bestimmung der enthaltenen Luciferaseaktivität durch Zugabe des Substrats Luciferin und Messung der Lumineszenz (Lichtfreisetzung) in einem Luminometer.

Die Daten in Tabelle 10 zeigen, dass die H1L6.1c2 Zellen auf die Behandlung mit dem AhR Agonisten  $\beta$ -Naphthoflavon (BNF) mit einer signifikanten Expression des stabil integrierten, AhR-kontrollierten Reportergens Luciferase reagierten. Die Behandlung mit 1  $\mu$ M BNF resultierte dabei in einer 8-fach stärkeren Induktion der Luciferase-Aktivität gegenüber den mit DMSO behandelten Zellen.

**Tab. 10:** Vergleich der Luciferaseaktivität von behandelten bzw. unbehandelten H1L6.1c2 Zellen

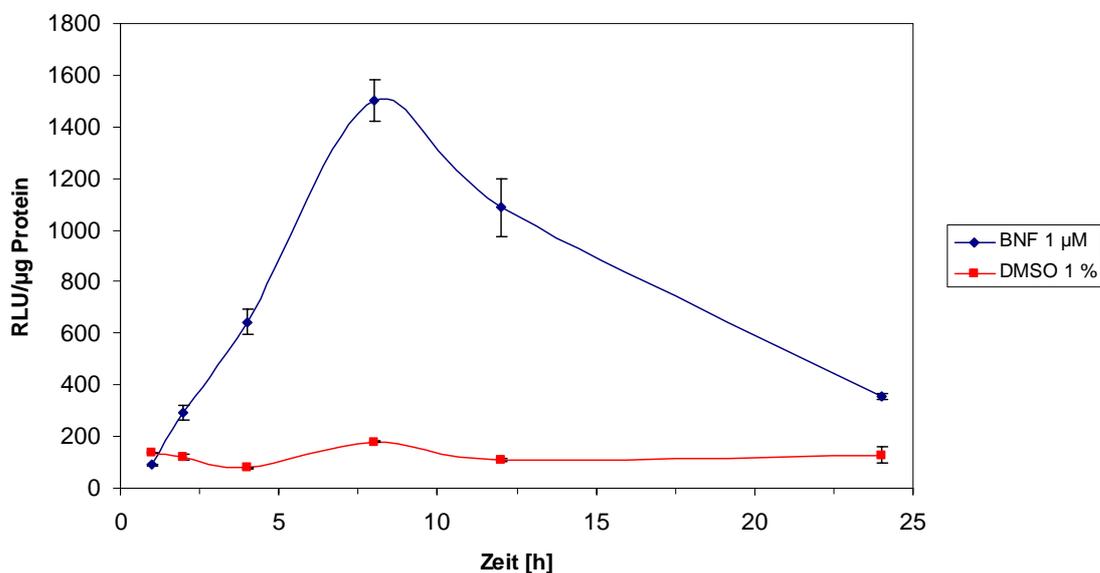
Behandlung der H1L6.1c2 Zellen	Relative Lumineszenzaktivität / $\mu$ g Protein <sup>a</sup>	Relative Induktion <sup>b</sup>
Medium	121 $\pm$ 22	
DMSO	154 $\pm$ 30	
BNF	1218 $\pm$ 87	8

a: Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei Bestimmungen

b: Daten repräsentieren die Induktion der Luciferaseaktivität von 1  $\mu$ M BNF gegenüber DMSO

### 2.2.2 Zeitlicher Verlauf der Luciferase-Expression

Der zeitliche Verlauf der Luciferase-Expression wurde untersucht, um die optimale Inkubationsdauer zur Messung der Luciferaseaktivität zu bestimmen. In diesem Experiment wurden die Zellen mit 1  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Naphthoflavon (BNF) bzw. mit 1 % DMSO im Medium behandelt und die Luciferaseaktivität zu verschiedenen Zeitpunkten bis zu 24 Stunden nach Beginn der Exposition bestimmt. Die durch BNF induzierbare Luciferaseaktivität war bereits nach zwei Stunden in den Zellen detektierbar, erreichte ihren Höchststand nach ungefähr acht Stunden und nahm ab ca. 12 Stunden nach Expositionsbeginn deutlich ab (Abb. 19). Obwohl die absolute induzierbare Luciferaseaktivität in den H1L6.1c2 Zellen mit der Inkubationszeit variiert, sind die Zellen dennoch für eine schnelle Detektion von AhR Liganden in einem Inkubationsintervall von ca. vier bis acht Stunden geeignet. Die relativ schnelle Induktionsrate ist insbesondere beim Screening von AhR Agonisten, die schnell metabolisiert werden, vorteilhaft.



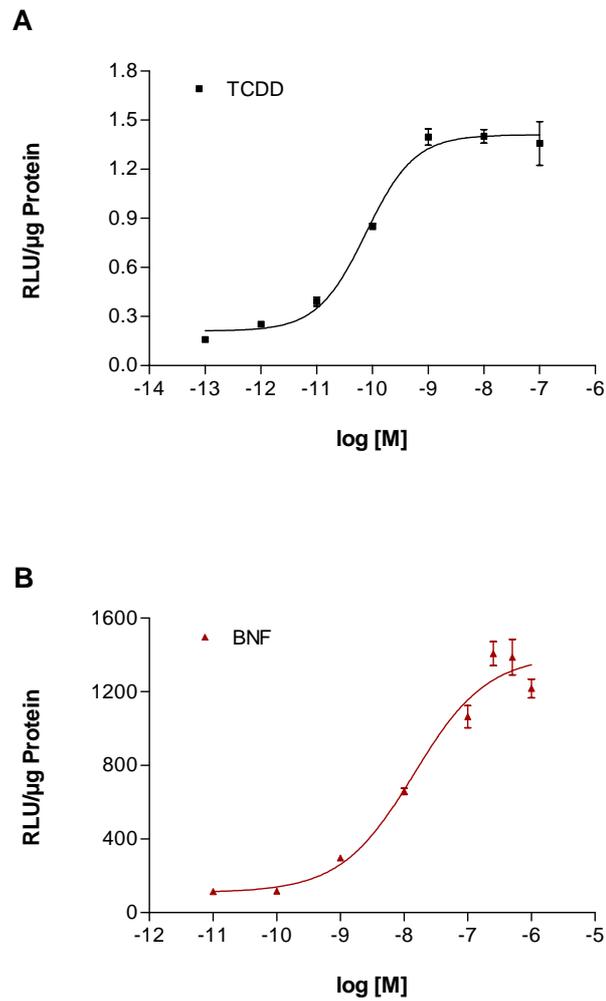
**Abb. 19:** Zeitlicher Verlauf der Luciferase-Induktion durch BNF in H1L6.1c2 Zellen. Nach Behandlung der Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  BNF bzw. 1 % DMSO wurden die Zellen bei 33  $^{\circ}\text{C}$  für die angegebenen Zeitintervalle inkubiert. Die aufgeführten Luciferaseaktivitäten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei Bestimmungen. Ab einer Inkubationszeit von zwei Stunden ist die durch BNF induzierte Luciferaseaktivität signifikant höher als die der DMSO-Kontrollprobe (Student's t-Test,  $p < 0,05$ ).

### 2.2.3 Charakterisierung des Ansprechens der H1L6.1c2 Zellen auf AhR Agonisten

Zur weiteren Validierung und Prüfung der Funktionsfähigkeit des Luciferase-Assays wurde, analog dem Vorgehen beim EGFP-Assay, das Ansprechen der H1L6.1c2 Zellen auf die AhR Agonisten BNF und TCDD mittels Dosis-Wirkungskurven charakterisiert. Zur Ermittlung dieser Dosis-Wirkungsbeziehungen wurden die Zellen mit unterschiedlichen Agonist-Konzentrationen bei 37 °C für vier Stunden inkubiert und die Luciferaseaktivität im Zelllysate ermittelt.

Die Evaluation der Ergebnisse erfolgte wie beim EGFP-Assay mittels Dosis-Wirkungskurven (vgl. Abschnitt C 2.1.3). Die Agonisten TCDD und BNF zeigten im Luciferase-Assay ebenfalls einen klassischen dosisabhängigen Effekt mit sigmoidalem Kurvenverlauf. Dabei wurde für die durch TCDD induzierte Luciferaseaktivität ein minimales Detektionslimit von ca. 1 pM, ein  $EC_{50}$ -Wert von 77 pM und eine maximale Induktion im Bereich von  $10^{-9}$  bis  $10^{-7}$  M ermittelt. Für BNF ergaben sich ein minimales Detektionslimit von 1 nM, ein  $EC_{50}$ -Wert von 14 nM und eine maximale Induktion im Bereich von 0,3  $\mu$ M (Abb. 20).

Es sei auch hier daraufhingewiesen, dass die niedrigeren numerischen Werte für die Luciferaseaktivität in Abbildung 20 (A), im Vergleich zu (B) nicht auf eine geringere Luciferase-Induktion, sondern auf die Verwendung zweier verschiedener Luminometer zurückzuführen sind. Da sich die instrumentelle Methode zur Lumineszenzdetektion und Quantifizierung in jedem Gerät unterscheidet, sind die erhaltenen numerischen Werte nicht direkt vergleichbar. Da die relative Größenordnung der Luciferase-Induktion jedoch immer gleich ist, lassen sich die resultierenden Aktivitäten verschiedener zu testender Proben durch Beziehen auf eine jeweils mitgeführte Referenzverbindung vergleichen.



**Abb. 20:** Dosis-Wirkungsbeziehung für die Luciferase-Induktion durch TCDD (A) und BNF (B). Die H1L6.1c2 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an TCDD bzw. BNF für vier Stunden bei 33 °C inkubiert und die induzierte Luciferaseaktivität nach Lyse der Zellen bestimmt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei Bestimmungen. Die Luciferaseaktivität bei  $10^{-12}$  M TCDD bzw.  $10^{-9}$  M BNF war signifikant höher als die der mitgeführten DMSO-Kontrolle (Student's t-Test,  $p < 0,05$ ).

### 2.2.4 Reproduzierbarkeit des Assays

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit des Luciferase-Assays wurden die durch 1  $\mu$ M  $\beta$ -Naphthoflavon (BNF) induzierten Luciferaseaktivitäten bei drei aufeinander folgenden Assays verglichen. Die ermittelten relativen Lumineszenzwerte pro  $\mu$ g Protein (RLU/ $\mu$ g Protein), ausgedrückt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, betragen  $5736 \pm 220$ ,  $5945 \pm 105$  und  $5427 \pm 118$ . Die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA-Test, Signifikanzniveau  $\alpha$ : 0,01) der drei unabhängig voneinander durchgeführten Ansätze zeigte, dass zwischen den Mittelwerten der Messungen keine signifikanten Unterschiede bestehen. Die Ähnlichkeit der Ergebnisse dieser drei Messungen belegt somit die hohe Reproduzierbarkeit des verwendeten Luciferase-Assays.

Die geringe absolute Standardabweichung bei Triplikat-Bestimmungen von  $\beta$ -Naphthoflavon (BNF) innerhalb eines einzelnen Ansatzes von typischerweise 3 %, wie z. B. in Abbildungen 19 und 20 eingezeichnet, belegten ebenfalls die gute Verlässlichkeit der Methode.

## 2.3 Einfluss der Serumkonzentration im Medium auf die Reporterexpression

Aus Zellkulturexperimenten ist bekannt, dass dem Medium zugesetztes Serum in kultivierten Zellen einen Einfluss auf CYP1A1-Induktoren wie TCDD und andere HAAs ausüben kann (Hestermann et al., 2000). Da diese Verbindungen hydrophob sind und somit nur eine begrenzte Löslichkeit in wässrigen Lösungen besitzen, können Serumbestandteile, wie Proteine und Lipide, einen signifikanten Einfluss auf die Bioverfügbarkeit und die Aufnahme in die Zellen haben. Da die Aufnahme in die Zellen den ersten Schritt im Toxizitätsmechanismus dieser Verbindungen darstellt, haben Effekte auf dieser Stufe auch Konsequenzen für alle daran anschließenden Zellantworten.

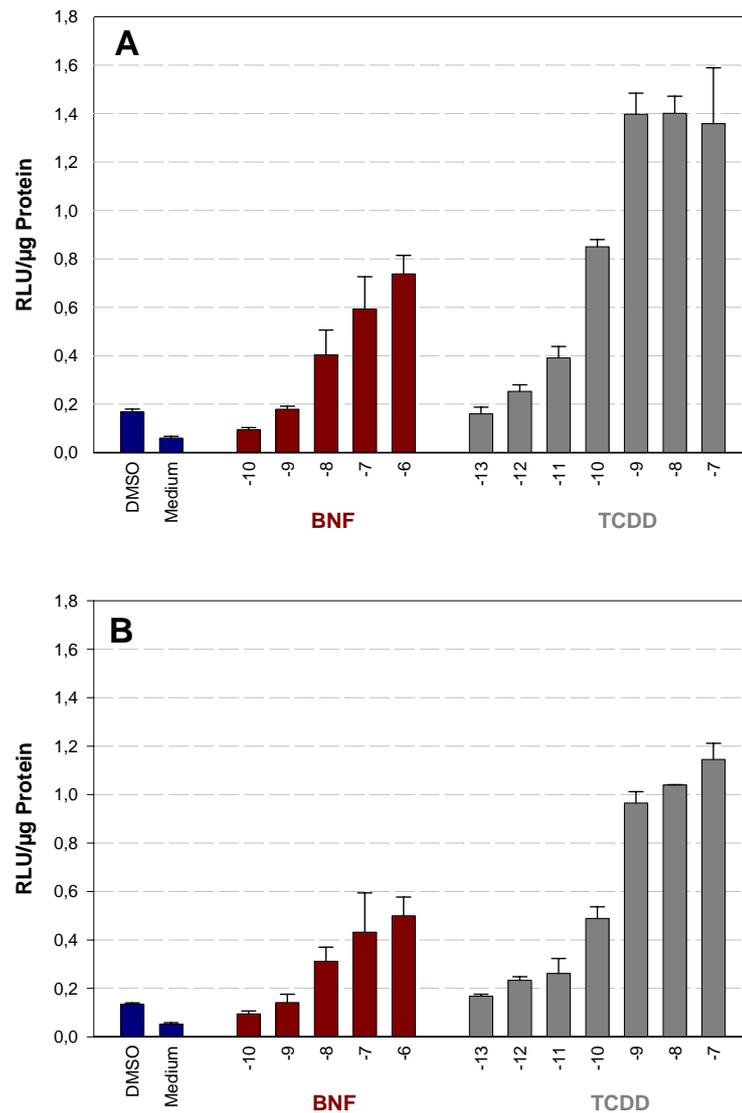
Serum selbst ist eine chemisch wenig definierte Mischung, die aus verschiedenen Tierarten in unterschiedlichen Entwicklungsstadien gewonnen werden kann und die in ihrer Zusammensetzung häufig eine erhebliche Variabilität aufweist. Seren enthalten

Hormone, Bindungsproteine, Anheftungs- und Wachstumsfaktoren, die die Proliferation der kultivierten Zellen stark beeinflussen. Die Anforderungen verschiedener Zelllinien hinsichtlich der Supplementierung des Mediums mit Serum bei ihrer Kultivierung unterscheiden sich zum Teil sehr stark. Sie reichen von der Verwendung serumfreier Medien bis hin zum Zusatz von 20 % Serum im Medium.

Hestermann und Mitarbeiter (2000) zeigten bei ihren Untersuchungen an PLHC-1 Fischleberzellen, dass die Aufnahme und die Induktionspotentiale von halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen sehr stark von der Zusammensetzung des Zellkulturmediums abhängen. So stieg der  $EC_{50}$ -Wert für die Induktion der CYP1A1-abhängigen EROD-Aktivität durch TCDD in Gegenwart von 10 % Kälberserum (FKS) im Medium um den Faktor 20 gegenüber der Verwendung von serumfreiem Medium an.

Ausgehend von diesen Ergebnissen bei den PLHC-1 Zellen untersuchten wir den Einfluss der Serumkonzentration im Medium bei unserem von der Mausleberzelllinie Hepa1c1c7 abgeleiteten Luciferase-Reportergenbioassay. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen an  $\beta$ -Naphthoflavon bzw. an TCDD nach dem Standardprotokoll mit den H1L6.1c2 Zellen inkubiert und die exprimierte Luciferase vermessen. Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen für die Verwendung von serumfreiem Medium und mit 10 % FKS supplementiertem Medium.

Wie aus Abbildung 21 ersichtlich, sind sowohl bei TCDD als auch bei BNF die gemessenen relativen Lichteinheiten/ $\mu$ g Protein im Ansatz mit 0 % FKS gegenüber dem Ansatz mit 10 % FKS erniedrigt. In beiden Ansätzen war dabei erwartungsgemäß die dosis-abhängige Luciferase-Expression erkennbar. Für TCDD ergab sich im serumfreien Medium ein  $EC_{50}$ -Wert von 210 pM. Dieser ist gegenüber dem  $EC_{50}$ -Wert in Medium mit 10 % FKS um den Faktor 3 erhöht. Für  $\beta$ -Naphthoflavon wurde im serumfreien Ansatz ein  $EC_{50}$ -Wert von 9 nM ermittelt, der dem  $EC_{50}$ -Wert von 14 nM im Ansatz mit 10 % FKS entspricht.



**Abb. 21:** Dosis-abhängige Luciferase-Reporterexpression durch TCDD und BNF bei Supplementierung des Zellkulturmediums mit 10 % FKS (A) bzw. mit 0 % FKS (B). Aufgetragen ist der Logarithmus der entsprechenden Konzentrationen an Testsubstanz, sowie zum Vergleich 1 % DMSO und unbehandeltes Medium. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei Bestimmungen.

Der bei der Fischleberzelllinie PLHC-1 beschriebene Einfluss des Serumgehalts im Medium auf die Induktionsstärke von AhR Liganden ließ sich in den von uns eingesetzten, von Hepa1c1c7-abgeleiteten H1L6.1c2 Zellen nicht nachweisen. Im Unterschied zu den Ergebnissen von Hestermann und Mitarbeitern (2000) zeigten unsere Experimente, dass bei Verzicht auf Supplementierung des Mediums mit Serum

zum Erreichen eines Induktionseffekts zum Teil höhere nominale Konzentrationen eines Testliganden eingesetzt werden müssen als es bei Verwendung von serumhaltigen Medium der Fall ist. Dies ließ sich auch aus dem höheren  $EC_{50}$ -Wert für TCDD in den Ansätzen mit serumfreiem Medium ablesen.

Auch bei unseren Bioassay-Systemen ist davon auszugehen, dass TCDD und andere hydrophobe Liganden an Serumbestandteile binden und die tatsächlich wirksame Ligandenkonzentration geringer als die nominal angegebene Konzentration ist. Die ermittelten  $EC_{50}$ -Werte von TCDD und BNF für serumfreies und serumhaltiges Medium zeigen jedoch, dass diese Unterschiede nicht stark ausgeprägt sind. Darüber hinaus ist aus den bei serumfreien Medium erniedrigten relativen Lumineszenzeinheiten/ $\mu\text{g}$  Protein erkennbar, dass der Zusatz von Serum im Medium für die Proliferation und die Genexpression der Hepa-Zellen vorteilhaft ist. Daher wählten wir für unsere Bioassays ein mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) supplementiertes Zellkulturmedium, wie es auch die Zellkulturprotokolle für Hepa1c1c7 Zellen empfehlen.

## 2.4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei rekombinante, zellbasierte Bioassays in unserer Arbeitsgruppe etabliert, die über den Ah Rezeptor vermittelt und kontrolliert von spezifischen „dioxin responsive elements“ (DREs) die Reporterproteine EGFP bzw. Luciferase exprimieren (vgl. Abschnitt B 4.4). Mittels Untersuchungen zu den basalen und induzierbaren Reporterproteingehalten und durch Aufnahme von ausführlichen Dosis-Wirkungskurven konnte für die aus der Literatur bekannten AhR Agonisten BNF und TCDD die Funktionsfähigkeit beider Assays nachgewiesen werden. Dabei wurde gezeigt, dass die Behandlung der H1L6.1c2 und H1G1.1c3 Zellen mit TCDD bzw. BNF in einer zeit-, dosis-, AhR- und ligand-spezifischen Induktion der Reporterproteinaktivität resultiert. Die in diesen Studien für TCDD und BNF ermittelten  $EC_{50}$ - und MDL-Werte korrelierten sehr gut mit den für diese Assays in der Literatur beschriebenen Werten (vgl. Tab. 11). Sie demonstrierten die Sensitivität beider Assays und belegten deren Funktionsfähigkeit, womit auch eine Vergleichbarkeit unserer weiteren Experimente mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen ermöglicht wurde.

**Tab. 11:** Übersicht über in der Literatur publizierte und eigene  $EC_{50}$ - und MDL-Werte für TCDD und BNF für die verwendeten Zelllinien

	Reportervektor	Zelllinie	$EC_{50}$ [M]	MDL [M]	
TCDD	pGudLuc6.1	H1L6.1c2	$1 \cdot 10^{-11}$	$1 \cdot 10^{-12}$	Han et al., 2004
			$2,9 \cdot 10^{-11}$	$3 \cdot 10^{-12}$	Tsutsumi et al., 2003
			$7,7 \cdot 10^{-11}$	$1 \cdot 10^{-12}$	Eigene Daten
	pGreen1.1	H1G1.1c3	$1 \cdot 10^{-11}$	$1 \cdot 10^{-12}$	Han et al., 2004
			$1,8 \cdot 10^{-11}$	$1 \cdot 10^{-12}$	Nagy et al., 2002
			$2,5 \cdot 10^{-11}$	$1 \cdot 10^{-12}$	Eigene Daten
BNF	pGudLuc6.1	H1L6.1c2	$1,4 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-9}$	Eigene Daten
			pGreen1.1	H1G1.1c3	$5,8 \cdot 10^{-8}$
				$3,5 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-9}$

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass  $\beta$ -Naphthoflavon (BNF) ebenfalls über den Ah Rezeptor vermittelt die Expression des jeweiligen Reporterproteins induziert. Der

durch Aufnahme von Dosis-Wirkungsbeziehungen ermittelte  $EC_{50}$ -Wert lag bei beiden Assays, verglichen mit dem  $EC_{50}$ -Wert für den prototypischen Liganden TCDD, ungefähr um den Faktor 1000 höher. Es wurde somit eine ca. 1000-fach höhere Konzentration an BNF benötigt, um ein ähnliches Ausmaß der Induktionseffekte wie durch TCDD zu erreichen. Dieser Unterschied spiegelte sich auch in der verschobenen Dosis-Wirkungskurve wider. Trotz dieser unterschiedlichen Wirkstärken ist BNF, neben dem prototypischen Liganden TCDD, als starker Agonist des Ah Rezeptors einzuordnen.

Aufgrund der hohen Toxizität und Persistenz von TCDD und den damit verbundenen Sicherheits- und Entsorgungsanforderungen wurde, soweit möglich, auf die Verwendung von TCDD verzichtet und stattdessen BNF als geeignetes Referenzsystem in den einzelnen Experimenten eingesetzt. Die Stärke der durch eine Testsubstanz induzierten Reporterexpression wurde dabei im Verhältnis zu BNF ausgedrückt, was eine Einordnung der relativen Potenz der Testsubstanzen gewährleistete.

Der EGFP-Bioassay, auch CAFLUX-Assay („chemically activated fluorescence expression“) genannt, basiert auf der rekombinanten Zelllinie H1G1.1c3 und stellt eine unkomplizierte und kostengünstige Methode zur Messung der durch AhR Liganden induzierten Genexpression dar. Die Einfachheit der EGFP-Messung und die Möglichkeit zur wiederholten Messung der intakten Zellen erlauben es, die Expression des Reportergens kontinuierlich in „Echtzeit“ zu verfolgen und ermöglichen somit Studien zum zeitlichen Verlauf der EGFP-Induktion. Aufgrund der relativ langsamen Expression und Bildung des EGFP-Reporterproteins in den Zellen hat der EGFP-Bioassay jedoch nur einen eingeschränkten Nutzen für die Detektion von AhR Agonisten im Zeitraum bis etwa 12 Stunden nach Expositionsbeginn, sodass anhand des ermittelten zeitlichen Verlaufs der EGFP-Induktion eine Inkubationszeit von 24 Stunden bis zur Messung gewählt wurde.

Im Gegensatz zum EGFP-Assay ist die Durchführung des auf den H1L6.1c2 Zellen basierenden Luciferase-Assays deutlich aufwendiger, da zunächst eine Lyse der Zellen zur Freisetzung der gebildeten Luciferase und eine enzymatische Umsetzung zur Messung der Aktivität durchgeführt werden muss. Die Vorteile des Luciferase-Assays, auch CALUX-Assay („chemically activated luciferase expression“) genannt, ergeben

sich aus dem zeitlichen Verlauf der Reporterageninduktion. Während beim EGFP-Assay vier Stunden nach Expositionsbeginn erst 9 % der maximalen Aktivität erreicht werden, zeigt sich beim Luciferase-Assay eine deutlich schnellere Reporteragenexpression, die sich im Erreichen von 43 % der maximalen Aktivität zu diesem Zeitpunkt äußert. Für unsere weiteren Untersuchungen mittels des Luciferase-Assays wurde aus Gründen der Praktikabilität eine Inkubationsdauer von vier Stunden gewählt, obwohl das Maximum der Reporteragenexpression nach vierstündiger Exposition noch nicht erreicht war. Da die Messungen jedoch zum immer gleichen Zeitpunkt durchgeführt wurden, spiegeln die Ergebnisse somit jeweils die relative Stärke der Induktion zu diesem Zeitpunkt wider und gewährleisteten die Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

Das schnelle Ansprechen des Luciferase-Assays ist insbesondere vorteilhaft bei der Untersuchung von AhR Agonisten, die bei längerer Inkubationszeit in den Zellen durch Metabolismusvorgänge inaktiviert bzw. abgebaut werden und somit nur zu einer relativ flüchtigen Induktion der AhR-abhängigen Genexpression führen. Daneben ermöglicht es die Schnelligkeit der Induktion auch AhR Liganden zu erfassen, die metabolisch zu toxischen Produkten umgewandelt werden. Hingegen zeigen die H1G1.1c3 Zellen des EGFP-Bioassays eine langsamere Induktionsresponse und sind folglich besser geeignet für Screening und Charakterisierung von Proben mit metabolisch stabilen AhR Liganden, da hier die Dauer der Inkubation weniger kritisch ist.

Beide Zelllinien können somit aufgrund ihrer spezifischen Vorteile für die möglichst umfassende Identifizierung und Charakterisierung von AhR Liganden komplementär eingesetzt werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die auf den Zelllinien H1L6.1.c2 und H1G1.1c3 beruhenden Bioassays eine einfache, zuverlässige und reproduzierbare Identifizierung, Charakterisierung und relative Quantifizierung von AhR Liganden erlauben. Sie stellen somit effektive Testsysteme zur Detektion von Verbindungen, insbesondere auch von natürlich vorkommenden Verbindungen dar, die fähig sind den AhR Signalweg zu aktivieren. Mittels der hier vorgestellten Daten konnte die Funktionsfähigkeit der Assays in unseren Händen belegt und die Assays als validierte Testsysteme in unserer Arbeitsgruppe etabliert werden.

### **3 Identifizierung und Charakterisierung von $\beta$ -Carbolinderivaten als AhR Liganden mittels funktioneller Reporterassays**

#### **3.1 Einführung**

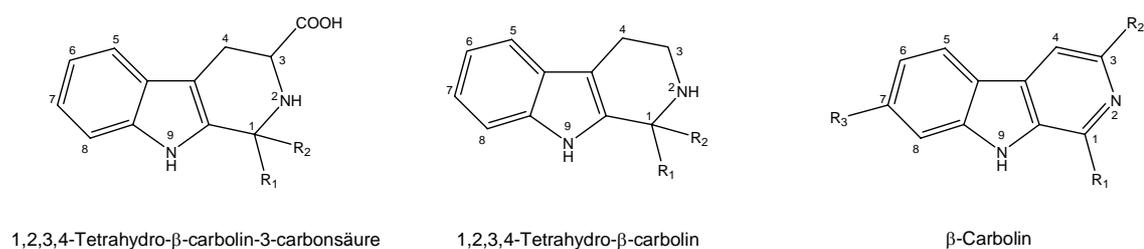
Während lipophile Verbindungen exogenen Ursprungs bereits seit langem als AhR Liganden bekannt sind, wurde erst in den letzten Jahren verstärkt Augenmerk auf hydrophile, natürliche bzw. endogene Verbindungen als mögliche AhR Agonisten und Antagonisten gelegt. Zu diesen Effektoren zählen z. B. heterozyklische Amine und indolhaltige Verbindungen wie Tryptophan, Tryptamin und Indolessigsäure, die als (sehr) schwache AhR Liganden identifiziert werden konnten (Heath-Pagliuso et al., 1998) (vgl. Abschnitt B 2.3).

Im Mittelpunkt unserer Untersuchungen stand die Klasse der  $\beta$ -Carboline und ihrer Derivate. Bedeutung für den Menschen erlangen die  $\beta$ -Carboline aufgrund ihres natürlichen Vorkommens in zahlreichen Lebensmitteln und im Säugerorganismus, das auf die Aufnahme über die Nahrung sowie auf eine mögliche endogene Bildung zurückzuführen ist (vgl. Abschnitt B 5). Diese bioaktiven Verbindungen sind als mögliche AhR Liganden in unser Interesse gerückt, da sie von der Aminosäure Tryptophan abgeleitet sind, die selbst als schwacher AhR Agonist identifiziert wurde und weil das trizyklische 9H-Pyridol[3,4-b]-Ringsystem der  $\beta$ -Carboline eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit zum prototypischen Agonisten TCDD bzw. zu anderen indolhaltigen AhR Liganden zeigt. Im Anschluss an die erfolgreiche Etablierung des Luciferase- und des GFP-Reporterassays in unserer Arbeitsgruppe wurden mittels dieser Bioassays zahlreiche Verbindungen aus der Klasse der  $\beta$ -Carboline und Tetrahydro- $\beta$ -Carboline auf ihre AhR Ligandenaktivität untersucht.

## 3.2 Screening von $\beta$ -Carbolinen und Derivaten

Ausgangsmaterial für unsere umfangreichen Reporterexperimente waren die von Tryptophan abgeleiteten klassischen  $\beta$ -Carboline, 1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -carboline, 1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-3-carbonsäuren und Tryptophan-Glykokonjugate, die wir im Rahmen des Forschungsprojekts „Vorkommen und Bedeutung von Tryptophan-Derivaten in Lebensmitteln“ als Tryptophanmetabolite in Nahrungsmitteln und zum Teil auch im Menschen identifiziert hatten (Gutsche und Herderich, 1998, Diem und Herderich, 2001a).

In ersten Screeningexperimenten wurden Vertreter dieser  $\beta$ -Carbolinderivate (Abb. 22) auf ihr agonistisches und antagonistisches Potential als AhR Liganden untersucht. Zur Prüfung der agonistischen Aktivität wurden die H1G1.1c3 Zellen mit den Testsubstanzen in der Konzentration 100  $\mu$ M inkubiert. Die Fähigkeit der Verbindungen in diesen Zellen die EGFP-Expression zu induzieren wurde in Relation zu  $\beta$ -Naphthoflavon (1  $\mu$ M BNF) als Positivkontrolle ausgedrückt. Daneben wurde in Koinkubationsexperimenten auch die antagonistische Aktivität der Testsubstanzen untersucht, indem diese zusammen mit 0,1  $\mu$ M BNF inkubiert wurden. Die hierbei gemessenen Fluoreszenzwerte wurden analog auf das Referenzsystem 0,1  $\mu$ M BNF bezogen.



**Abb. 22:** Grundgerüste der im Screening untersuchten  $\beta$ -Carbolinderivate

**Tabelle 12a:** Screening von 1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-3-carbonsäure-Derivaten auf AhR Ligandenaktivität mittels des EGFP-Bioassays

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Relative Fluoreszenz [%]	
			Agonismus <sup>a</sup>	Antagonismus <sup>b</sup>
T 1	- H	- H	n.b.	81,6 ± 0,9
T 2	- H	- CH <sub>3</sub>	18,4 ± 3,4	73,3 ± 0,9
T 5	- H	- COOH	31,5 ± 3,7	79,3 ± 1,0
T 6	- CH <sub>3</sub>	- COOH	31,2 ± 1,2	83,0 ± 0,7
T 7	- H	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	10,5 ± 1,1	93,8 ± 4,2
T 13	- H	- CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	24,4 ± 1,3	83,2 ± 0,7
T 14	- H	- CH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	26,2 ± 1,7	60,3 ± 0,2
T 15	- H	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	40,7 ± 4,5	69,4 ± 3,0
T 16	- H	- Phenyl	21,5 ± 2,9	134,1 ± 1,7
T 17	- H	- CHOH-CH <sub>2</sub> OH	34,8 ± 2,3	95,3 ± 0,8

**Tab. 12b:** Screening von 1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Derivaten auf AhR Ligandenaktivität mittels des EGFP-Bioassays

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Relative Fluoreszenz [%]	
			Agonismus <sup>a</sup>	Antagonismus <sup>b</sup>
T 3	- H	- H	65,0 ± 4,1	80,9 ± 0,4
T 4	- H	- CH <sub>3</sub>	67,5 ± 1,9	83,6 ± 1,0
6-Methoxy-T 3 (Pinolin)	- H	- H	32,9 ± 5,8	62,1 ± 7,6
T 8	- COOH	- H	47,4 ± 1,0	79,4 ± 1,7
6-Methoxy-T 8	- COOH	- H	28,5 ± 5,1	76,0 ± 0,5
T 9	- COOH	- CH <sub>3</sub>	33,8 ± 3,0	41,9 ± 0,3
T 18	- H	- Phenyl	38,3 ± 2,3	86,2 ± 3,5
T 19	- H	- CH <sub>2</sub> OH	44,5 ± 1,9	95,7 ± 3,1

**Tab. 12c:** Screening von  $\beta$ -Carbolinderivaten auf AhR Ligandenaktivität mittels des EGFP-Bioassays

	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>Relative Fluoreszenz [%]</b>	
				<b>Agonismus<sup>a</sup></b>	<b>Antagonismus<sup>b</sup></b>
Norharman	- H	- H	- H	4,5 ± 2,6	43,7 ± 0,4
Harman	- CH <sub>3</sub>	- H	- H	5,7 ± 0,2	41,4 ± 0,4
Harmin	- CH <sub>3</sub>	- H	- OCH <sub>3</sub>	3,7 ± 2,5	30,1 ± 0,4
Harmol	- CH <sub>3</sub>	- H	- OH	13,7 ± 2,7	43,2 ± 2,8
Harmalin (3,4-Dihydroharmin)	- CH <sub>3</sub>	- H	- OCH <sub>3</sub>	10,3 ± 1,3	58,9 ± 1,7
$\beta$ -Carbolin-3-COOH	- H	- COOH	- H	n.b.	79,9 ± 2,0
$\beta$ -Carbolin-3-carbon- säuremethylester	- H	- COOCH <sub>3</sub>	- H	153,8 ± 4,5	97,7 ± 3,3
$\beta$ -Carbolin-3-carbon- säureethylester	- H	- COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	- H	128,0 ± 5,9	81,7 ± 0,4
$\beta$ -Carbolin-3-N- methylcarboxamid	- H	- CONHCH <sub>3</sub>	- H	140,6 ± 7,7	82,2 ± 3,0
Benzalharman	- (2-phenyl- vinyl)	- H	- H	117,0 ± 2,0	95,4 ± 1,1

**Tab. 12 a-c:**

Die Grundgerüste der verschiedenen  $\beta$ -Carbolinderivate sind in Abb. 22 dargestellt.

Die Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei Bestimmungen.

- a:** Prüfung auf agonistische Aktivität: Relative Fluoreszenz in [%] bezogen auf das Referenzsystem 1  $\mu$ M BNF; bei Inkubation von jeweils 100  $\mu$ M Testsubstanz
- b:** Prüfung auf antagonistische Aktivität: Relative Fluoreszenz in [%] bezogen auf das Referenzsystem 0,1  $\mu$ M BNF; bei Koinkubation von 100  $\mu$ M Testsubstanz mit 0,1  $\mu$ M BNF
- n.b.:** nicht bestimmt

Die Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Derivate sind mit dem Buchstaben T und nachgestellter Zahl gekennzeichnet, wobei Diastereomere nicht unterschieden werden. Zur Untersuchung wurden die Testsubstanzen als Mischungen beider Diastereomere bzw. das Hauptdiastereomer eingesetzt. Die  $\beta$ -Carboline werden mit ihrem Trivialnamen bzw. mit den aus ihrer Struktur abgeleiteten Namen bezeichnet.

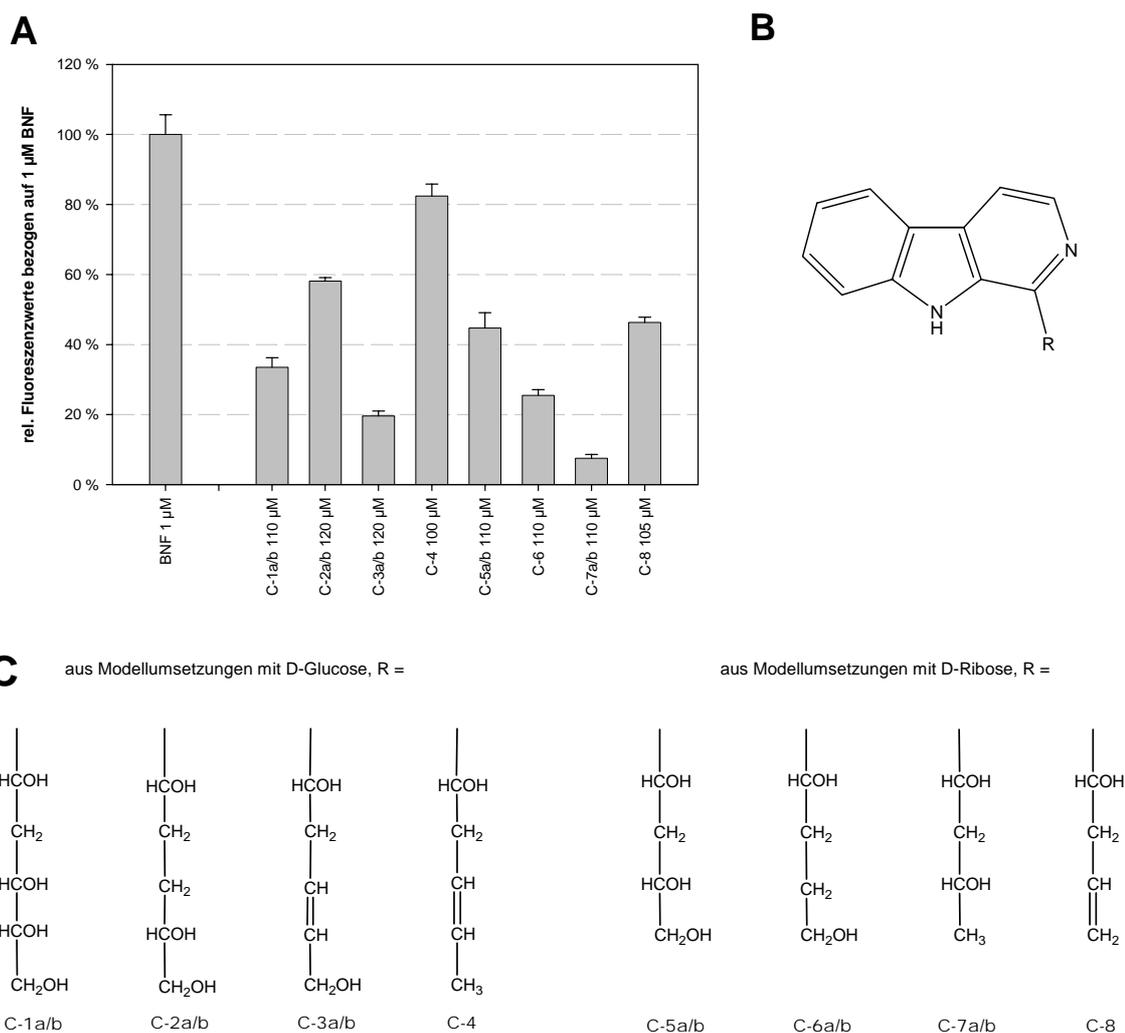
Für die Koinkubationsexperimente wurde  $\beta$ -Naphthoflavon in der Konzentration 0,1  $\mu$ M eingesetzt, um zu vermeiden, dass eine Übersättigung des Ah Rezeptors mit

diesem Agonisten, wie im Bereich des oberen Plateaus der Dosis-Wirkungsbeziehung für BNF (vgl. Abb. 18), vorliegt und somit mögliche inhibierende Effekte der Testsubstanzen überdeckt werden könnten.

Das Screening von zehn 1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-3-carbonsäure-Derivaten, acht 1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Derivaten und zehn  $\beta$ -Carbolinen auf agonistische und antagonistische Aktivität im GFP-Reportergenassay ließ erkennen, dass zahlreiche  $\beta$ -Carbolinderivate als schwache bis mäßige AhR Agonisten eingeordnet werden können (Tabellen 12a, 12b und 12c). Insbesondere die  $\beta$ -Carboline  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester,  $\beta$ -Carbolin-3-N-methylcarboxamid und  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-ethylester wiesen ein ausgeprägtes agonistisches Potential auf. Im Unterschied zu ihren Tetrahydro-Analoga T 3 und T 4 konnten die  $\beta$ -Carboline Harman und Norharman die EGFP-Reportergenexpression nicht induzieren. Bei Koinkubationsexperimenten mit simultaner Inkubation dieser  $\beta$ -Carboline in Gegenwart des starken Induktors  $\beta$ -Naphthoflavon (BNF) zeigte sich jedoch, dass diese in der Lage sind, die durch 0,1  $\mu$ M BNF induzierte Genexpression zu schwächen bzw. zu unterdrücken. Harman und Norharman besitzen somit ein antagonistisches Potential, die von  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure abgeleiteten Methyl- und Ethylester weisen hingegen ein agonistisches Potential auf. Diese Verbindungen mit ausgeprägtem agonistischen bzw. antagonistischen Effekten im EGFP-Screeningassay wurden zur weiteren Charakterisierung durch  $EC_{50}$ - und  $IC_{50}$ -Werte in den Bioassays herangezogen (vgl. C 3.3).

Neben obigen Verbindungen wurden weitere  $\beta$ -Carbolinderivate aus Modellumsetzungen von Tryptophan mit D-Glucose bzw. D-Ribose auf ihre AhR Ligandenaktivität untersucht. Diese Tryptophan-Glykokonjugate waren in vorhergehenden Studien identifiziert und ihr Vorkommen in Lebensmitteln nachgewiesen worden (Diem und Herderich, 2001a). Sie wurden nun mit Hilfe des EGFP-Bioassays auf ihre Fähigkeit untersucht den AhR Signalweg zu aktivieren und die Reportergenexpression zu induzieren.

Die Tryptophan-Glykoderivate sind mit dem Buchstaben C (für Carboline) und einer Zahl für das Substitutionsmuster gekennzeichnet. Stereoisomere werden durch die nachgestellten Buchstaben a und b unterschieden.



**Abb. 23:** Screening von verschiedenen  $\beta$ -Carbolinderivaten aus den Modellumsetzungen von L-Tryptophan mit D-Glucose bzw. D-Ribose mittels des EGFP-Reportergenassays. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei Bestimmungen (A). Grundstruktur (B) und Übersicht über die verschiedenen Substituenten R am Position C1 der aus Modellumsetzungen von L-Tryptophan mit D-Glucose bzw. D-Ribose isolierten  $\beta$ -Carbolinderivate (C)

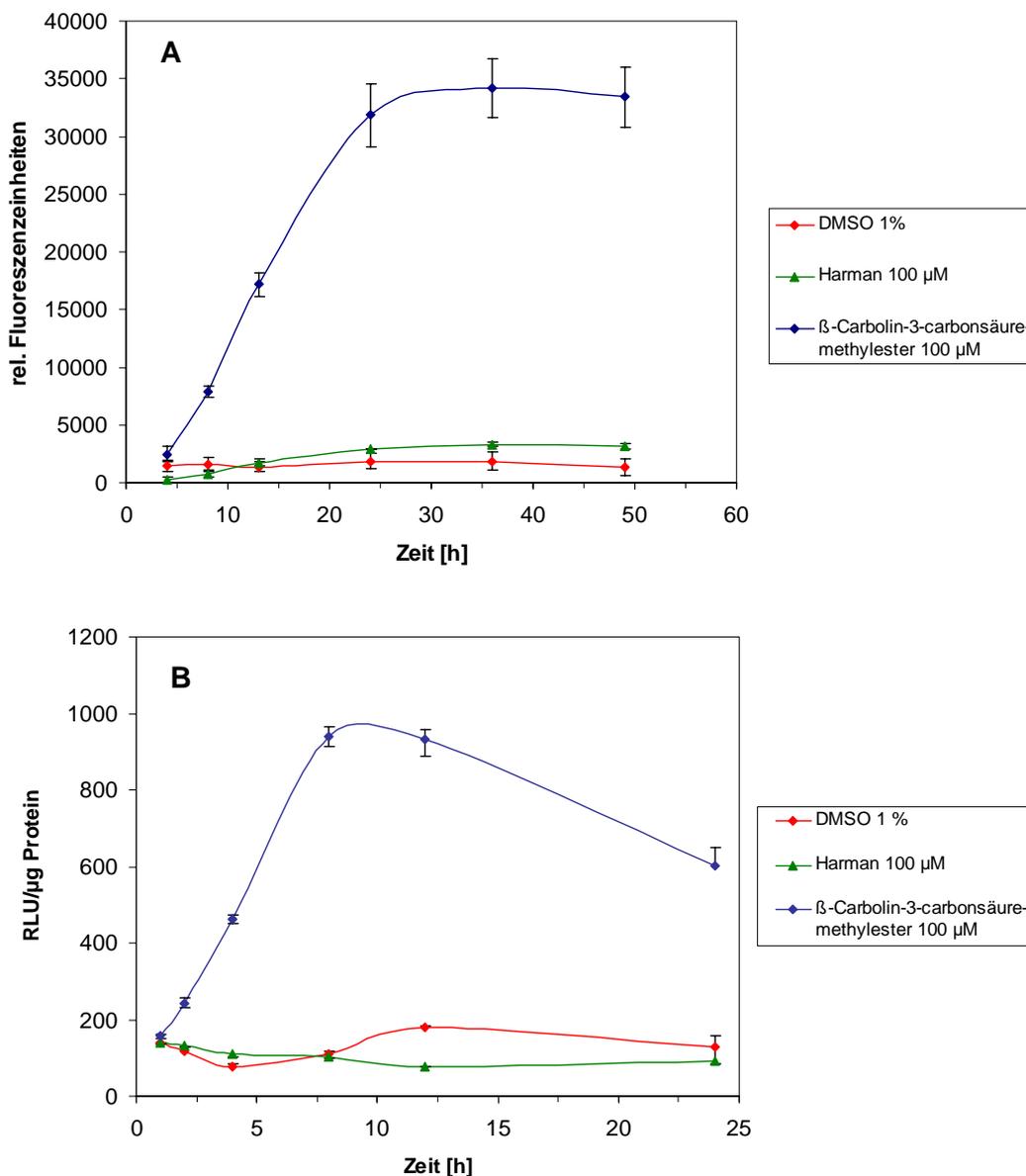
Wie aus Abbildung 23 ersichtlich, sind diese Verbindungen in Konzentrationen von 100 bis 120  $\mu$ M in der Lage die AhR vermittelte EGFP-Reportergenexpression in unterschiedlichem Maße zu induzieren und sind als weitere Beispiele für schwache AhR Liganden natürlichen Ursprungs einzuordnen. Da nur sehr geringe Mengen dieser Isolate zur Verfügung standen, musste auf eine weitergehende Charakterisierung, insbesondere von Verbindung C-4, mittels Dosis-Wirkungskurven verzichtet werden.

### **3.3 Charakterisierung der $\beta$ -Carboline hinsichtlich ihrer Ligandenaktivitäten**

Ausgehend vom Screening einer Vielzahl von  $\beta$ -Carbolinderivaten (vgl. Abschnitt C 3.2) wurden die Verbindungen  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester,  $\beta$ -Carbolin-3-N-methylcarboxamid und  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-ethylester sowie Harman, Harmin, Harmalin und Norharman für eine eingehendere Charakterisierung ausgewählt. Diese erfolgte insbesondere durch Aufnahme von Dosis-Wirkungsbeziehungen und Ermittlung der entsprechenden kennzeichnenden  $EC_{50}$ - bzw.  $IC_{50}$ -Werte. Zur Beschreibung agonistischer Liganden wurde dabei die induzierte Reporter-genaktivität in Abhängigkeit von der Ligand-Konzentration untersucht. Bei antagonistischen Liganden erfolgte diese Untersuchung in Gegenwart des AhR Agonisten  $\beta$ -Naphthoflavon in sogenannten Koinkubationsexperimenten. Tabelle 13 gibt eine Übersicht dieser Untersuchungsergebnisse. Exemplarisch für die  $\beta$ -Carboline mit ausgeprägten induzierenden bzw. inhibierenden Effekten in den Screeningexperimenten soll die Charakterisierung dieser Effekte für die Verbindungen  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester und Harman anhand des EGFP- und Luciferase-Assays im Folgenden hier dargestellt werden.

#### **3.3.1 Charakterisierung agonistisch wirkender $\beta$ -Carboline**

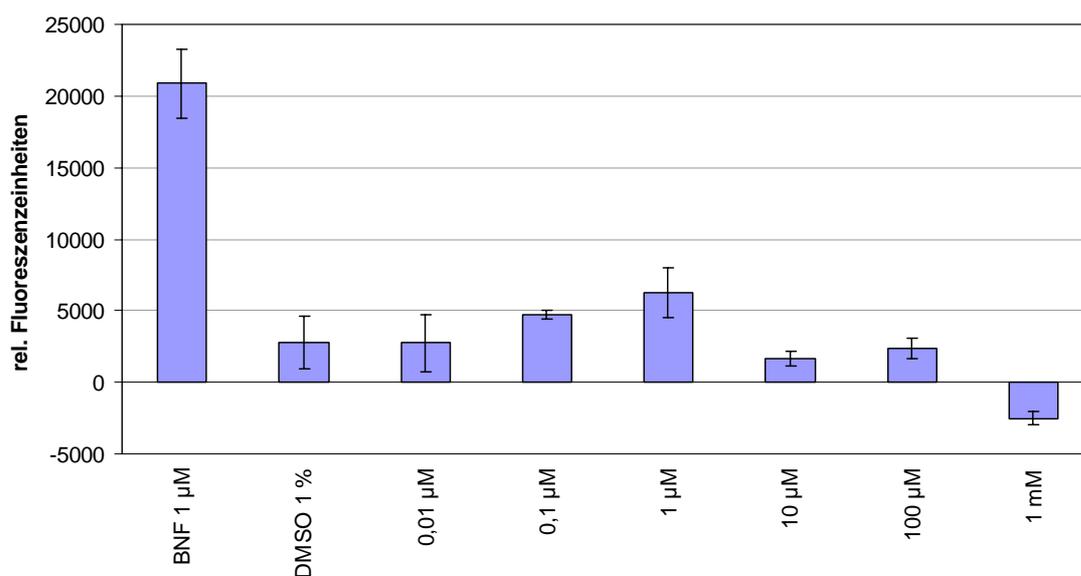
Zur eingehenden Prüfung agonistischer Effekte wurde der zeitliche Verlauf der durch  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester und Harman ausgelösten Reporter-genexpression untersucht (Abb. 24). Wie aus Abbildung 24 ersichtlich, zeigt sich im zeitlichen Verlauf für  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester ein von der Inkubationsdauer abhängiger Anstieg der EGFP- bzw. Luciferase-Expression, wie es auch bei den klassischen AhR Agonisten TCDD und BNF der Fall ist (vgl. Abschnitt C 2.1 und 2.2). Im Gegensatz dazu bleibt die durch Harman induzierte Genexpression auf dem Expressionsniveau der Negativkontrolle von 1 % DMSO im Medium. Harman weist somit keine agonistische Aktivität auf.



**Abb. 24:** Zeitlicher Verlauf der Reporterexpression durch  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester, Harman und DMSO im EGFP- (**A**) und im Luciferase-Bioassay (**B**). Die je mit 100  $\mu$ M Testsubstanz behandelten Zellen wurden für die angegebenen Zeitintervalle inkubiert. Die Fluoreszenz- und Lumineszenzwerte repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei Bestimmungen.

Daneben wurde auch die Dosisabhängigkeit der Reporterexpression für  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester und Harman untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 als Balkendiagramm für Harman sowie in Abbildung 26 als Dosis-Wirkungskurve für  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester dargestellt. Sie belegen die dosis-

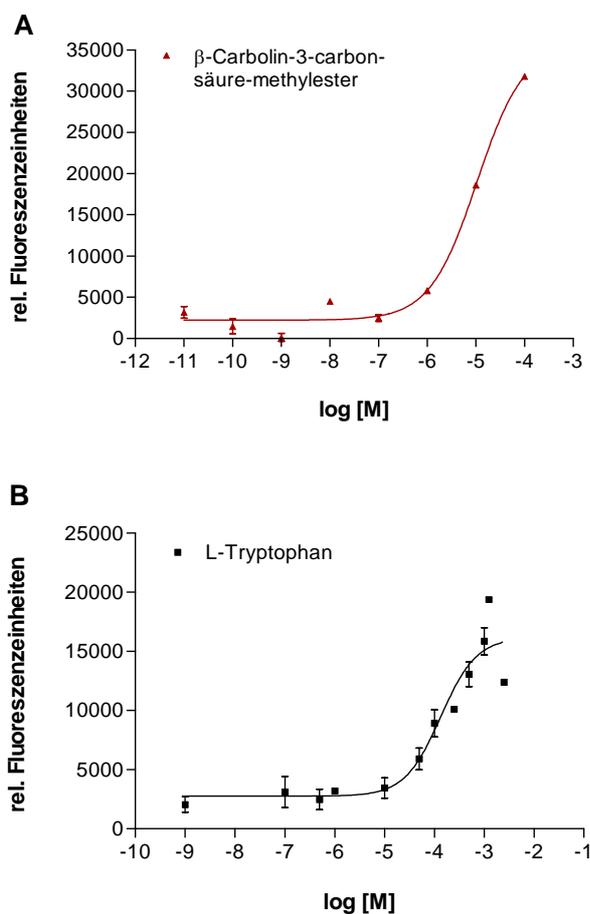
abhängige Genexpression durch  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester, da das Ausmaß der induzierten Reporterexpression mit steigender Konzentration des eingesetzten  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylesters zunimmt (Abb. 26). Dahingegen bewegen sich die für unterschiedliche Harman-Konzentrationen ermittelten Fluoreszenzwerte im Bereich der Negativkontrolle mit 1 % DMSO im Medium. Harman besitzt somit keine bzw. im Bereich von 0,1 bis 1  $\mu$ M eine nur minimale Fähigkeit die EGFP-Expression zu induzieren. (Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit Hilfe des Luciferase-Bioassays ermittelt.) Die bei 1 mM Harman ermittelten negativen Fluoreszenzwerte sind auf toxische Effekte zurückzuführen, die zu einem Absterben der Zellen führten, welches auch mikroskopisch durch das Ablösen des Zelllayers in den entsprechenden Wells erkennbar war (vgl. Abb 25).



**Abb. 25:** Untersuchung der Dosisabhängigkeit der EGFP-Reporterexpression von Harman. H1G1.1c3-Zellen wurden dazu mit den aufgeführten Konzentrationen an Harman nach dem Standardprotokoll inkubiert. Die angegebenen Fluoreszenzwerte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei Bestimmungen.

Abbildung 26 vergleicht die Dosis-Wirkungsbeziehungen für  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester und Tryptophan. Da die Konzentrationen an  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester bzw. Tryptophan in den Proben mit dem Ausmaß der Reporterexpression korrelierte, ergab sich ein dosisabhängiger Effekt bei sigmoiden Kurven-

verlauf. Die berechneten  $EC_{50}$ -Werte betragen  $13 \mu\text{M}$  für  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäuremethylester und  $135 \mu\text{M}$  für Tryptophan und belegen die Fähigkeit dieser Verbindungen als Agonisten des Ah Rezeptors zu wirken.



**Abb. 26:** Dosis-Wirkungsbeziehungen für die EGFP-Induktion durch die AhR-Agonisten  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäuremethylester (**A**) und L-Tryptophan (**B**). Die H1G1.1c3 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäuremethylester bzw. L-Tryptophan nach dem Standardprotokoll inkubiert und die EGFP-Fluoreszenz gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei Bestimmungen.

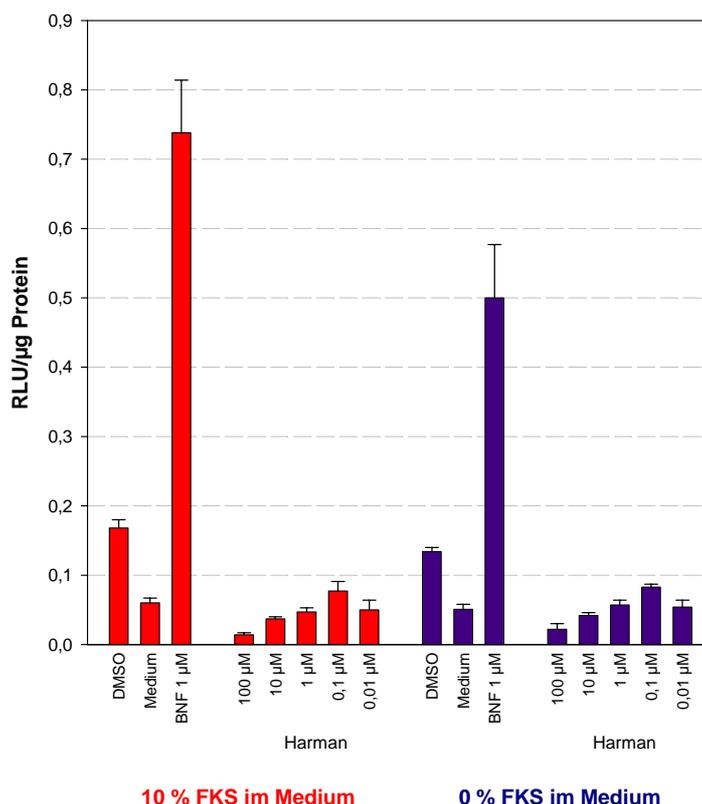
Aus dem graphischen Verlauf der Dosis-Wirkungskurven für  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäuremethylester und Tryptophan sind auch die mit dieser Methode verbundenen Schwierigkeiten ersichtlich:

Im oberen Bereich der Dosis-Wirkungskurve können unspezifische Wirkungen wie Cytotoxizität und Löslichkeitsverhalten eine wesentliche Rolle spielen, die die Festlegung des maximalen Wirkplateaus und somit auch des Wendepunktes ( $EC_{50}$ -Wert) der Kurve erschweren. Der „aktive“ Bereich der  $\beta$ -Carboline und von Tryptophan ist relativ schmal und erstreckt sich nur über einen engen Konzentrationsbereich von zwei bis drei Zehnerpotenzen. Bei darunterliegenden niedrigen Konzentrationen sind keine Effekte beobachtbar, während bei höheren Konzentrationen Störungen, z. B. aufgrund toxischer Effekte, auftreten können.

Das von uns gewählte Dosis-Wirkungsmodell basiert auf der sogenannten „variable slope sigmoidal equation“ und beruht auf der Grundannahme, dass die Testverbindungen als vollständige Agonisten wirken und ein sigmoides Verhalten vorliegt. Dabei können die initialen Top- bzw. Bottom-Werte des oberen und unteren Plateaus anhand der ermittelten maximalen bzw. minimalen Response festgelegt werden. Als iteratives Verfahren erlaubt es dieses Modell die  $EC_{50}$ -Werte (im Folgenden auch die  $IC_{50}$ -Werte) nach einem für alle Testverbindungen einheitlichem Standardverfahren zu berechnen.

Wie in Abschnitt C 2.3 dargestellt, kann bei kultivierten Zellen die Serumkonzentration im Medium die Zellproliferation und Genexpression beeinflussen. Da die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten  $\beta$ -Carboline einen hydrophoben Charakter aufweisen, ist anzunehmen, dass es auch in diesen Fällen zur Bindung an Serumbestandteile kommen kann. Um auszuschließen, dass die nicht induzierbare Genexpression bei einigen  $\beta$ -Carbolinen auf einem drastischen Verlust an Testsubstanz durch Bindung an Serumbestandteile beruht, wurde exemplarisch für das  $\beta$ -Carbolin Harman der Einfluss der Serumkonzentration auf die Luciferase-Reporterexpression untersucht. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen an Harman nach dem Standardprotokoll mit den H1L6.1c2 Zellen inkubiert und die exprimierte Luciferase vermessen. Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen für die Verwendung von serumfreiem Medium und mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) supplementiertem Medium. Sowohl bei 10 %, als auch bei 0 % FKS im Medium werden durch die eingesetzten Harman-Konzentrationen nur Lumineszenzwerte erreicht, die kleiner sind als die der Negativkontrolle 1 % DMSO. Ein Einfluss der

Serumkonzentration auf die durch das  $\beta$ -Carbolin Harman induzierte Luciferase-Expression ist somit nicht erkennbar. Die fehlende Reporterexpression durch Harman ist daher nicht auf Verluste durch Bindung dieser Substanz an Serumbestandteile zurückführbar.

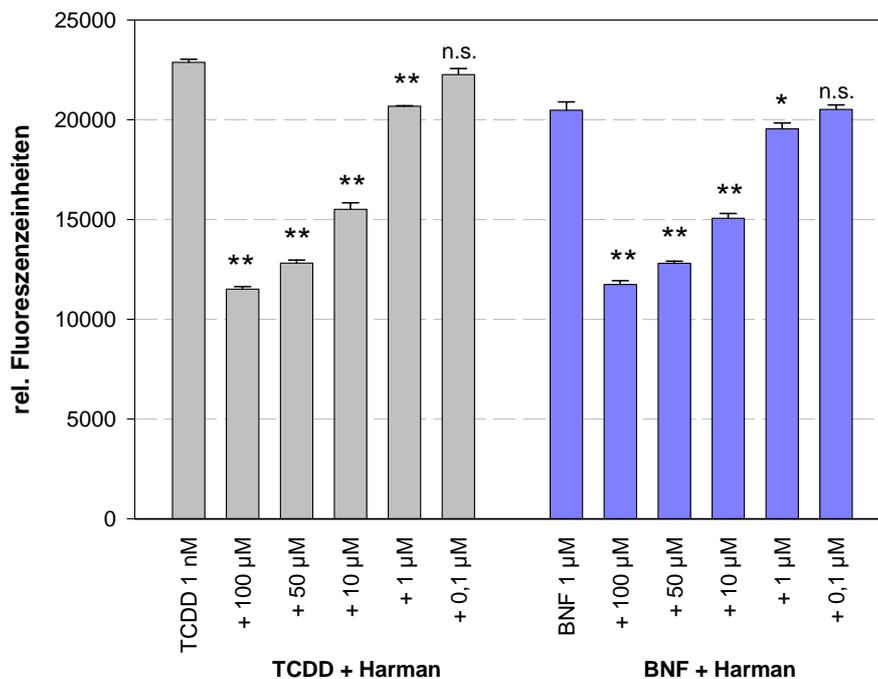


**Abb. 27:** Dosis-abhängige Luciferase-Reporterexpression durch Harman bei Supplementierung des Zellkulturmediums mit 10 % FKS (rot) bzw. mit 0 % FKS (blau). Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei Bestimmungen.

Basierend auf obigen Experimenten lässt sich also zusammenfassen, dass das  $\beta$ -Carbolin Harman unabhängig von der Dosis und unabhängig von der Dauer der Inkubation nicht fähig ist, den AhR vermittelten Genexpressionsmechanismus zu aktivieren und somit nicht als AhR Agonist eingestuft werden kann. Im Gegensatz dazu wurde für das  $\beta$ -Carbolin  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester eine dosis- und zeitabhängige Reporterexpression nachgewiesen. Anhand des  $EC_{50}$ -Wert von 13  $\mu$ M wurde  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester als ein mittelstarker AhR Agonist charakterisiert.

### 3.3.2 Charakterisierung antagonistisch wirkender $\beta$ -Carboline

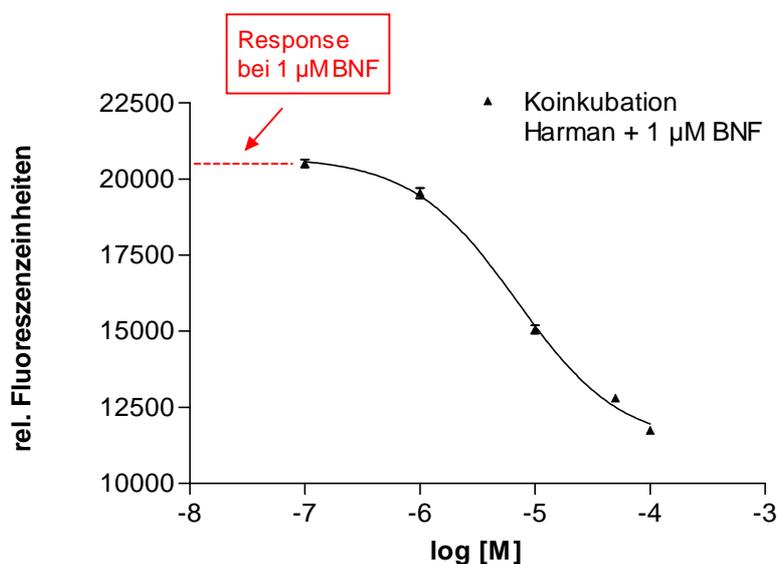
Wie aus den Screeningassays (vgl. Abschnitt C 3.2) ersichtlich, inhibierten Harman und weitere  $\beta$ -Carboline wie Norharman, Harmin und Harmalin die durch  $\beta$ -Naphthoflavon induzierte Reporterexpression. Ausgehend von diesen ersten Hinweisen auf das antagonistische Potential dieser  $\beta$ -Carboline war es unser Ziel den Inhibierungseffekt näher zu bestimmen. Dazu wurde der Einfluss von steigenden, abgestuften Antagonist-Konzentrationen auf eine einzelne, feste Agonist-Konzentration untersucht. Die Ergebnisse dieser Koinkubationen für Harman und TCDD bzw. für Harman und BNF sind in Abbildung 28 dargestellt.



**Abb. 28:** Koinkubation von 1 nM TCDD bzw. 1  $\mu$ M BNF mit variablen Konzentrationen an Harman. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus jeweils drei Bestimmungen. Fluoreszenzwerte für die Koinkubationen mit Harman, die signifikant geringer sind als die TCDD- bzw. BNF-Kontrolle bei  $P < 0,05$  (\*) oder  $P < 0,01$  (\*\*) (bestimmt mittels Student's t-Test) sind gekennzeichnet.

Es zeigte sich, dass Harman im Konzentrationsbereich von 1 bis 100  $\mu\text{M}$  die durch 1 nM TCDD bzw. 1  $\mu\text{M}$  BNF induzierte EGFP-Expression signifikant reduzierte und somit fähig war die Reporterexpression dosisabhängig zu inhibieren.

Koinkubationsansätze von Agonist und Antagonist erlauben es den dosis-abhängigen Inhibierungseffekt über mehrere Größenordnungen an Antagonist-Konzentrationen zu verfolgen. Dieses gewählte experimentelle Vorgehen wird auch als Antagonist-Inhibierungskurve („antagonist inhibition curve“) bezeichnet und beschreibt ebenfalls eine sigmoide Dosis-Wirkungskurve. Die sich ergebende Kurve wird durch den  $\text{IC}_{50}$ -Wert gekennzeichnet. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert beschreibt die Konzentration des Antagonisten, bei der der ursprüngliche Effekt (Response) des Agonisten auf 50 % reduziert ist. Abbildung 29 zeigt die Antagonist-Inhibierungskurve für die Inkubation von variablen Konzentrationen an Harman in Gegenwart des AhR Agonisten  $\beta$ -Naphthoflavon. Die durch 1  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Naphthoflavon bedingte Reporterexpression (oberes Plateau) ließ sich durch Harman konzentrationsabhängig antagonisieren.



**Abb. 29:** Antagonist-Inhibierungskurve für die Koinkubation von 1  $\mu\text{M}$  BNF mit variablen Konzentrationen an Harman. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert beträgt 7  $\mu\text{M}$ . Die Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus jeweils drei Bestimmungen. Die durch die feste Agonist-Konzentration hervorgerufene Response ist durch die gepunktete Linie gekennzeichnet.

### 3.3.3 Überblick über das agonistische und antagonistische Potential ausgewählter $\beta$ -Carboline

Ausgehend von den Ergebnissen der Screeningassays wurden ausgewählte Vertreter aus der Klasse der  $\beta$ -Carboline auf ihr agonistisches und antagonistisches Potential als AhR Liganden zu wirken untersucht. Diese Charakterisierung erfolgte mittels Reportergenassays über Dosis-Wirkungskurven und Antagonist-Inhibierungskurven.

Um eine Einordnung und Gewichtung der AhR Ligandenaktivitäten der aufgeführten  $\beta$ -Carboline zu ermöglichen, wurden die in der Literatur beschriebenen natürlichen Liganden L-Tryptophan und Indol-3-essigsäure (Heath-Pagliuso et al., 1998) sowie Ellipticin (Gasiewicz et al., 1996) in analoger Weise untersucht. Zusätzlich zu den ermittelten  $EC_{50}$ -Werten von TCDD und BNF erlaubten diese Referenzliganden einen Vergleich der „Stärke“ der verschiedenen  $\beta$ -Carboline als agonistische bzw. antagonistische Liganden des Ah Rezeptors.

Tabelle 13 fasst die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammen. Der Vergleich der ermittelten  $EC_{50}$ -Werte zeigt, dass die untersuchten  $\beta$ -Carboline  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester,  $\beta$ -Carbolin-3-N-methylcarboxamid und  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-ethylester deutlich schwächere Agonisten als TCDD bzw. BNF sind. Gegenüber den bisher identifizierten natürlichen AhR Agonisten wie Tryptophan, die als schwache Agonisten zu bewerten sind, zeigen die untersuchten  $\beta$ -Carboline ein leicht stärkeres agonistisches Potential.

Mittels Koinkubationen mit dem Agonisten  $\beta$ -Naphthoflavon konnten die  $\beta$ -Carboline Harman, Norharman, Harmalin und Harmin eindeutig als Antagonisten des AhR vermittelten Signaltransduktionswegs identifiziert werden. Die für diese Verbindungen durch Antagonist-Inhibierungskurven ermittelten  $IC_{50}$ -Werte liegen im unteren  $\mu$ M-Bereich. Harman, Norharman, Harmalin und Harmin weisen somit ein analog starkes antagonistisches Potential wie der bereits bekannte AhR Antagonist Ellipticin auf.

**Tab. 13:** EC<sub>50</sub>- und IC<sub>50</sub>-Werte ausgewählter  $\beta$ -Carboline und AhR Liganden

	EC <sub>50</sub>		IC <sub>50</sub>	
	GFP	Luciferase	GFP <sup>a</sup>	Luciferase
TCDD	25 pM	77 pM	-	-
BNF	35 nM	14 nM	-	-
$\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester	13 $\mu$ M	19 $\mu$ M	-	-
$\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-ethylester	11 $\mu$ M	13 $\mu$ M	-	-
$\beta$ -Carbolin-3-N-methyl-carboxamid	17 $\mu$ M	24 $\mu$ M.	-	-
T 3	26 $\mu$ M	22 $\mu$ M	-	-
T 4	61 $\mu$ M	28 $\mu$ M	-	-
L-Tryptophan	135 $\mu$ M	n.b.	-	-
Indol-3-essigsäure	105 $\mu$ M	n.b.	-	-
Harman	-	-	7 $\mu$ M	n.b.
Norharman	-	-	9 $\mu$ M	n.b.
Harmalin	-	-	21 $\mu$ M	n.b.
Harmin	-	-	6 $\mu$ M	n.b.
Ellipticin <sup>b</sup>	-	-	13 $\mu$ M	n.b.

**n.b.:** nicht bestimmt

**a:** Die Koinkubationen von variablen Antagonist-Konzentrationen erfolgten jeweils mit 1  $\mu$ M BNF.

**b:** Ellipticin wurde von Gasiewicz und Mitarbeitern (1996) mit Hilfe eines Bioassays, der auf einem Luciferase-Reportergenkonstrukt in Hepa-Zellen basierte, als AhR Antagonist identifiziert. Sie wiesen einen inhibierenden Effekt auf die TCDD-induzierte Luciferaseaktivität nach und ermittelten einen IC<sub>50</sub>-Wert von  $78 \pm 35$  nM. Der Unterschied zu dem hier ermittelten IC<sub>50</sub>-Wert von 13  $\mu$ M ist auf die gewählten experimentellen Bedingungen zurückzuführen, die sich hinsichtlich der Art und Konzentration des Agonisten und hinsichtlich des Reportergenkonstrukts unterscheiden.

### 3.4 Diskussion der Ergebnisse

Unsere Untersuchungen zum AhR Ligandenpotential verschiedener  $\beta$ -Carbolinderivate erfolgten mittels der etablierten EGFP- und Luciferase-Bioassays. Diese basieren auf Mausleberzellen, die mit DRE-abhängigen Reportergenkonstrukten stabil transfiziert waren. Die Expression der Reportergene wird dabei durch den Ah Rezeptor kontrolliert. Nachdem im Rahmen dieser Arbeit die Testsysteme validiert worden waren, führten Screeningexperimente zur Identifizierung mehrerer  $\beta$ -Carbolinderivate, die fähig sind die AhR kontrollierte Reporterexpression zu induzieren bzw. zu inhibieren.

Da erste Untersuchungen Hinweise auf mögliche agonistische und antagonistische Effekte von  $\beta$ -Carbolinderivaten aufgezeigt hatten, wurde die Wirkung ausgewählter AhR Liganden mittels der funktionellen Testsysteme systematisch charakterisiert. Anhand von Dosis-Wirkungsbeziehungen und den daraus abgeleiteten  $EC_{50}$ -Werten wurden  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester,  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-ethylester und  $\beta$ -Carbolin-3-N-methylcarboxamid als Agonisten des Ah Rezeptors identifiziert. Ein Vergleich der  $EC_{50}$ -Werte dieser  $\beta$ -Carboline mit denen der prototypischen Agonisten TCDD und BNF zeigte, dass die untersuchten  $\beta$ -Carboline um den Faktor  $10^6$  bzw.  $10^3$  schwächere Agonisten als diese klassischen Liganden sind. Gegenüber dem bekannten natürlichen AhR Agonisten Tryptophan, das als ein schwacher Agonist zu bewerten ist, weisen diese  $\beta$ -Carboline somit ein leicht erhöhtes agonistisches Potential auf.

Neben dem agonistischen Potential wurden die funktionellen Bioassays auch zur Untersuchung von Kombinationseffekten des AhR Agonisten BNF mit möglichen Antagonisten herangezogen. Anhand von Antagonist-Inhibierungskurven und den entsprechenden  $IC_{50}$ -Werten gelang es,  $\beta$ -Carboline mit antagonistischem Potential zu charakterisieren. So wurden für die  $\beta$ -Carboline Harman, Norharman, Harmin und Harmalin  $IC_{50}$ -Werte ermittelt, die mit dem  $IC_{50}$ -Wert des typischen Antagonisten Ellipticin vergleichbar sind (Gasiewicz et al., 1996).

Anhand unserer Untersuchungen mit funktionellen Reporterassays konnten wir zeigen, dass verschiedene  $\beta$ -Carboline in der Lage sind die AhR-abhängige Reporter-

genexpression zu induzieren. Diese Agonisten sind folglich auch Induktoren der AhR vermittelten Expression zahlreicher Phase I- und Phase II-Enzyme, welche über analoge Signaltransduktionsmechanismen kontrolliert werden (vgl. Abb. 2 und Tab. 3).

Endogen gebildete bzw. über die Nahrung aufgenommene  $\beta$ -Carboline sind also prinzipiell in der Lage den Gehalt der entsprechenden Metabolismuseenzyme im Körper zu modulieren, indem sie die Expression dieser Enzyme über den molekularen Signaltransduktionsmechanismus des Ah Rezeptors entweder verstärken oder unterdrücken. Durch eine solche mögliche Beeinflussung der Detoxifizierungsprozesse könnten  $\beta$ -Carboline Bedeutung als Regulatoren des Xenobiotika-Metabolismus erlangen.

Unsere „indirekten“ Untersuchungen der AhR vermittelten Enzyminduktion basierten auf den zellulären und molekularen Prozessen in Reportergensystemen. Dagegen untersuchten Hümmerich und Mitarbeiter (2004) die Induktion von CYP1A1 auf mRNA-Ebene durch semi-quantitative RT-PCR und auf Proteinebene durch Western Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern. Für Harman ergab sich in den RT-PCR Experimenten ein  $EC_{50}$ -Wert von 210  $\mu$ M in der Rattenleberzelllinie H4IIE bzw. von 27  $\mu$ M in der humanen Brustzelllinie MCF-7. Harman wurde in diesen Untersuchungen somit als ein schwacher Induktor der CYP1A1-Aktivität (gegenüber einem  $EC_{50}$ -Wert von 1 nM für TCDD) identifiziert, während unsere Untersuchungen an Mausleberzellen keine Induktion der AhR vermittelten Reportergenexpression belegten.

Hümmerich und Mitarbeiter (2004) nehmen aufgrund ihrer Ergebnisse an, dass die CYP1A1 Aktivität nicht ausschließlich als physiologische Antwort gegenüber Liganden des Ah Rezeptors anzusehen ist, sondern dass möglicherweise auch östrogen-aktive Verbindungen diese beeinflussen können. Da CYP1A1 ein außerordentlich wichtiges und effektives Detoxifizierungssystem darstellt, das am Metabolismus vielfältiger Verbindungen beteiligt ist, ist es vorstellbar, dass neben dem AhR vermittelten Signaltransduktionsmechanismus weitere molekulare Mechanismen existieren, die zur Expression von CYP1A1 führen. Auch der Nachweis von Wechselwirkungen („Cross-talk“) des Ah Rezeptors mit dem Signalweg des Östrogenrezeptors (Safe et al., 1998; Wang et al., 1998; Spink et al., 2003) stützt diese Hypothese.

Zusätzlich zu dem von uns nachgewiesenen antagonistischen Potential von Harman auf molekularer Ebene des AhR Signalwegs konnten Hümmerich und Mitarbeiter (2004) zeigen, dass Harman die CYP1A1 abhängige EROD-Aktivität in Lebermikrosomen inhibiert. Nii (2003) berichtete, dass Norharman die EROD-Aktivität in den Lebermikrosomen von Ratten mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 35 µM inhibiert.

Es ist beschrieben, dass zahlreiche AhR Liganden, darunter auch indolhaltige Verbindungen, über die Wechselwirkung mit dem Ah Rezeptor ihren eigenen Metabolismus stimulieren (Denison und Whitlock, 1995; Heath-Pagliuso et al., 1998). Jedoch liegen zum metabolischen Abbau der β-Carboline im Körper nur wenige Studien vor. Dabei wurden sowohl methylierte, als auch hydroxylierte Metabolite identifiziert (Tweedie et al., 1988; Guan et al., 2001). Da diese Untersuchungen zum Metabolismus nach intravenöser und oraler Gabe bzw. durch Inkubation mit Lebermikrosomen erfolgte, wurden hier keine Erkenntnisse zu den an diesen Prozessen beteiligten Enzymen gewonnen. Über Inkubationen mit Lebermikrosomen hinaus untersuchten Yu und Mitarbeiter (2003) auch den Beitrag einzelner, rekombinant hergestellter Cytochrom P450 Isoenzyme zum Metabolismus von Harmin und Harmalin. Sie zeigten, dass CYP1A1 und insbesondere CYP1A2 und CYP2D6 die an der O-Demethylierung von Harmin und Harmalin beteiligten Hauptisoenzyme sind. Da die Expression dieser Enzyme (Genprodukte) durch den Ah Rezeptor als ligand-abhängiger Transkriptionsfaktor reguliert wird (vgl. Abschnitt B 3.2), kann auch ein Zusammenhang zwischen den β-Carbolinen als AhR Liganden und der Stimulierung ihres eigenen Metabolismus hergestellt werden.

Eine mögliche Relevanz der β-Carboline als AhR Liganden ergibt sich aus dem Vorkommen dieser Verbindungen im Säugerorganismus sowie in verschiedenen Nahrungsmitteln (vgl. Abschnitt B 5.1 und 5.2). Insbesondere für die β-Carboline Harman und Norharman, die sich in den funktionellen Reporterassays als AhR Liganden mit antagonistischem Wirkpotential erwiesen, sind die Gehalte in Lebensmitteln und Körpergeweben sehr gut untersucht.

Ausgehend von den bekannten Quellen für Harman und Norharman in der menschlichen Nahrung schätzen Pfau und Skog (2004) die maximale tägliche

Aufnahme für Norharman auf 4,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht und für Harman auf 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht. Die orale Bioverfügbarkeit, wie sie in Tierexperimenten (Guan et al., 2001) und in Verzehrstudien mit Freiwilligen (Fekkes et al., 2001a) bestimmt wurde, liegt bei unter 20 %. Zusätzlich zur Aufnahme von Harman und Norharman aus externen Quellen kann auch die Aufnahme von Vorläuferverbindungen der  $\beta$ -Carboline zu erhöhten Plasmagehalten führen, wie es für L-Tryptophan nachgewiesen werden konnte (Fekkes et al., 2001a und 2001b). Es wird angenommen, dass auch Dihydro- und Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-Derivate *in vivo* in Norharman und Harman umgewandelt werden können.

Neben der Ernährung ist Tabakrauch eine weitere wichtige Quelle für  $\beta$ -Carboline. Abhängig von den individuellen Rauchgewohnheiten kann bei einem angenommenen Konsum von 20 Zigaretten die Aufnahme von Norharman bis 1,14  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht und von Harman 0,57  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht betragen (Pfau und Skog, 2004). Auch ist die inhalative Exposition gegenüber der oralen Exposition mit einer schnelleren und effektiveren Aufnahme der  $\beta$ -Carboline verbunden, wie durch den schnellen Anstieg der Plasmagehalte an Harman und Norharman beim Rauchen nachgewiesen werden konnte (Fekkes et al., 2001a; Rommelspacher et al., 2002).

Pfau und Skog (2004) haben auch die endogene Bildung der  $\beta$ -Carboline anhand von Plasmagehalten und Halbwertszeiten für die Elimination aus dem Körper abgeschätzt. Die tägliche endogene Bildung könnte ungefähr 50 bis 100 ng/kg Körpergewicht Norharman und etwa 20 ng Harman betragen, wobei diese Gehalte durch die Aufnahme von Precursoren beeinflusst werden können.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass  $\beta$ -Carboline prinzipiell in der Lage sind den AhR Signaltransduktionsweg zu aktivieren bzw. zu inhibieren. Aus physiologischer Sicht ist jedoch zu bemerken, dass die bei Probanden ermittelten Plasmagehalte bis zu 228 pg/ml für Harman bzw. bis zu 47 pg/ml für Norharman (Tab. 8) betragen. Das entspricht 1,3 nM Harman bzw. 0,3 nM Norharman und liegt deutlich unter den in den Assays aktiven Konzentrationen dieser  $\beta$ -Carboline. Nur für den natürlichen Liganden Tryptophan liegen die Referenzwerte im Plasma für Erwachsene mit 1,2 bis 1,8 mg/dl,

das entspricht 59 bis 88  $\mu\text{M}$ , durchaus im Bereich des für Tryptophan ermittelten  $\text{EC}_{50}$ -Werts von 135  $\mu\text{M}$ .

Ausgehend von den Gehalten an  $\beta$ -Carbolinen in Lebensmitteln und Tabakrauch, verbunden mit ihrer relativ niedrigen Bioverfügbarkeit und ihrer relativ schwachen agonistischen bzw. antagonistischen Wirkstärke in den *in vivo* Bioassays, ist die physiologische Relevanz der  $\beta$ -Carboline als Liganden des Ah Rezeptors und als Modulatoren des Xenobiotika-Metabolismus als begrenzt zu beurteilen. Es ist jedoch denkbar, dass additive oder synergistische Wirkungen von Mischungen dieser einzeln nicht „aktiven“ Konzentrationen an  $\beta$ -Carbolinen durchaus zu AhR vermittelten Effekten bzw. zur Expression von AhR kontrollierten Genprodukten beitragen können.

Neben den normalen physiologischen Bedingungen werden jedoch auch pathologische Zustände beschrieben, bei denen es durch lokale Akkumulation zu höheren  $\beta$ -Carbolin-Gehalten in Körpergeweben kommen kann. So ist ein Anstieg der Gehalte an Harman und Norharman durch Rommelspacher und Mitarbeiter (1994) in der Leber von Ratten beschrieben wurden, die mit den Monoaminoxidase-Inhibitor Clorgylin behandelt wurden. Es wird angenommen, dass die Hemmung des metabolischen Abbaus in der Leber durch Clorgylin für diese erhöhten  $\beta$ -Carbolin-Konzentrationen verantwortlich ist (Rommelspacher et al., 1994). Die unter solchen Umständen auftretenden Konzentrationen lassen eine physiologische Wirkung der  $\beta$ -Carboline zumindest möglich erscheinen.

## 4 Charakterisierung von $\beta$ -Carbolinen als Liganden des Ah Rezeptors mittels Gelretardation Assays

### 4.1 Einführung

Eine Möglichkeit zur detaillierteren Charakterisierung der agonistischen und antagonistischen Wirkungen von  $\beta$ -Carbolinderivaten über die Reporterassays hinaus, beruht auf der Untersuchung von verschiedenen aufeinanderfolgenden Schritten im AhR Regulationsmechanismus. Die Analyse von Einzelschritten des AhR vermittelten Regulationsmechanismus ist besonders bei AhR Antagonisten, wie den in Kapitel C 2 beschriebenen  $\beta$ -Carbolinderivaten von Interesse, da hier geklärt werden kann auf welcher Stufe dieser Mechanismus abgebrochen wird. Während die rekombinanten Zellbioassays ausschließlich den korrekten und vollständigen Ablauf des AhR vermittelten Signaltransduktionsmechanismus bis zur Genexpression beschreiben, ermöglichen es DNA-Bindungsassays (Gelretardation Assay, GRA) speziell die ligandabhängige Aktivierung des Ah Rezeptors und die Transformation des AhR-Ligand-Komplexes in seine DNA-Bindungsform zu untersuchen (vgl. Abb. 2, Abschnitte B 1.2 und B 4.2).

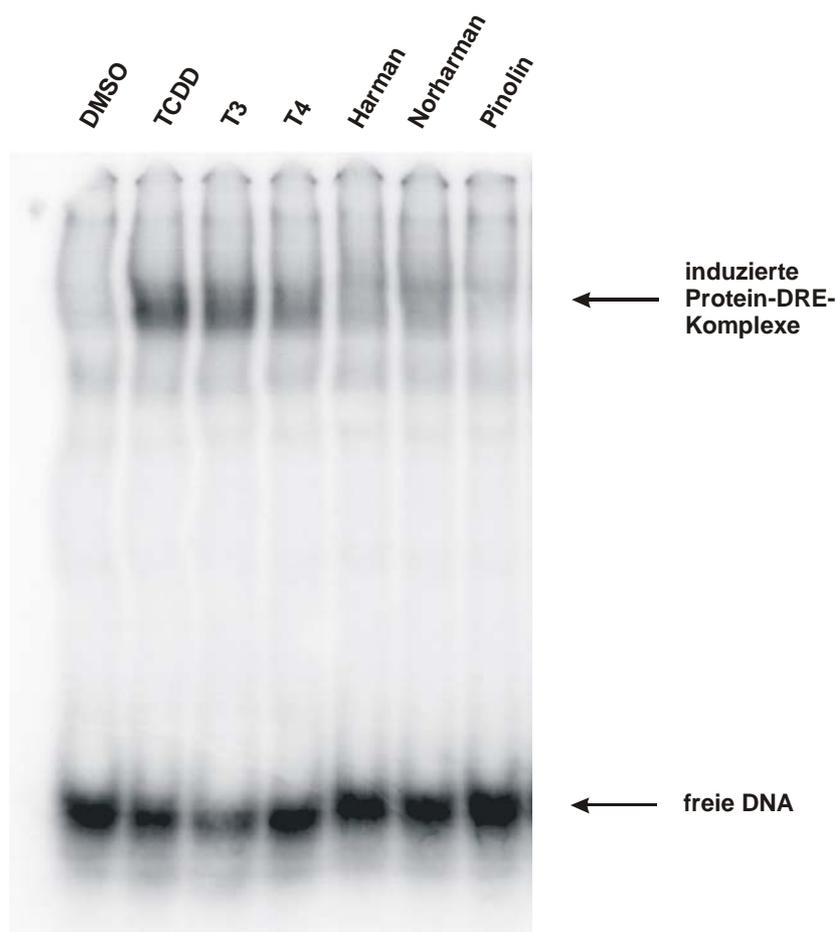
Mechanistisch folgt auf die Bindung des Liganden an den Ah Rezeptor die Ausbildung des AhR-Ligand-Arnt-Komplexes, der eine hohe Affinität zur DNA aufweist und als transkriptionaler Aktivator an spezifische DNA-Erkennungssequenzen bindet, die DRE (dioxin responsive elements) genannt werden. Im Falle des *in vitro* Gelretardation Assays wurde als Quelle für die Ah Rezeptoren Meerschweinchen-Lebercytosol verwendet, während im *ex vivo* Gelretardation Assay die AhR-Ligand-Komplexe aus den Zellkernen von kultivierten, mit AhR Liganden inkubierten Zellen extrahiert wurden. Die cytosolischen Ansätze und die Zellkernextrakte wurden mit  $^{32}\text{P}$ -markierten DRE-Oligonukleotiden inkubiert und die Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Die DRE-

Bindungskomplexe wurden durch die  $^{32}\text{P}$ -Markierung und durch die charakteristische Laufstrecke auf dem Elektrophorese-Gel detektiert.

## 4.2 GRA mit Meerschweinchen-Lebercytosol

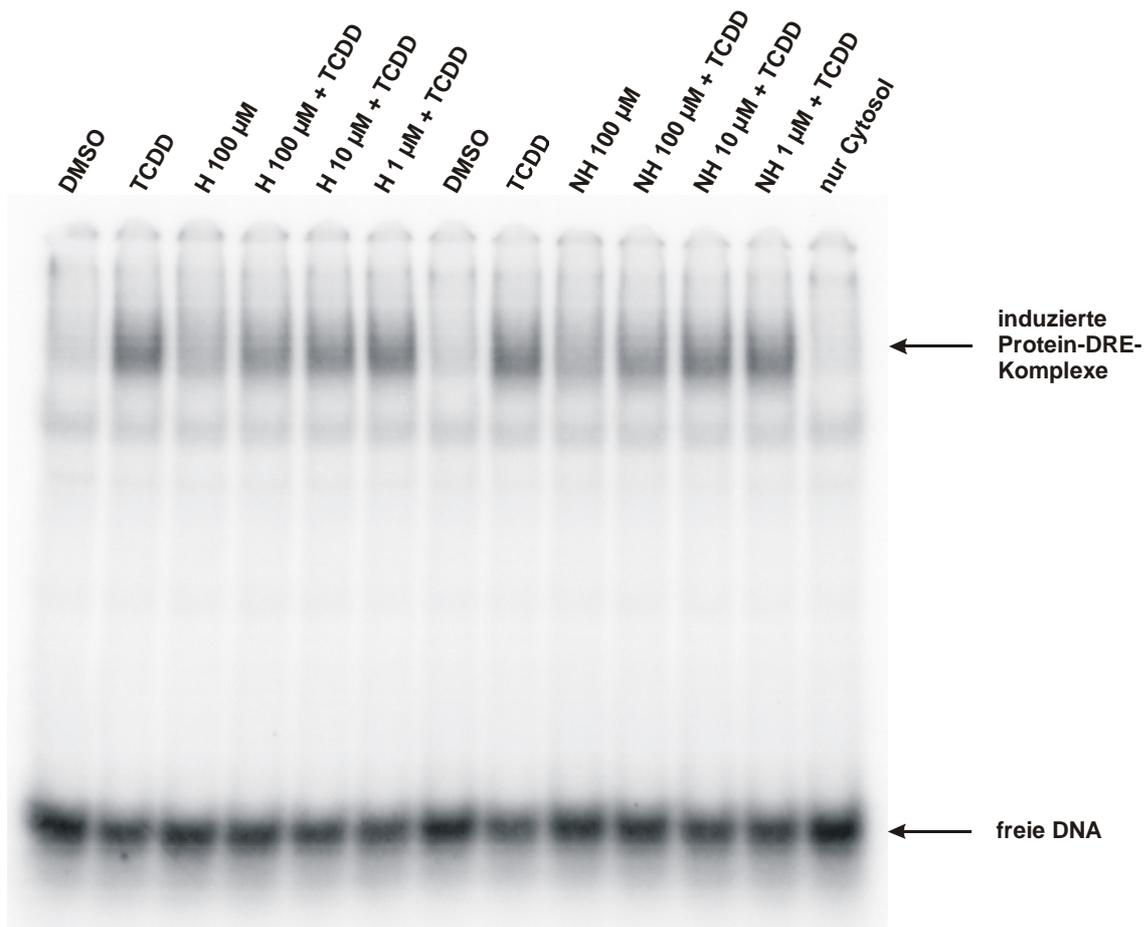
Bei der Untersuchung der ligand-abhängigen Aktivierung des Ah Rezeptors und der Transformation des AhR-Ligand-Komplexes in seine DNA-Bindungsform diente im *in vitro* GRA Meerschweinchen-Lebercytosol als Quelle für die Ah Rezeptoren. Dieses wurde mit DMSO, TCDD oder der jeweiligen Testverbindung sowie mit den  $^{32}\text{P}$ -markierten DRE-Oligonukleotiden inkubiert und die Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Identifizierung der Protein-DRE-Banden wurden die Gele mittels Autoradiographie entwickelt. Die Quantifizierung der durch Inkubation mit den Testsubstanzen induzierten Protein-DNA-Komplexe erfolgte mit Hilfe eines Phosphoimagers.

Abbildung 30 zeigt den Phosphoimager-Scan des GRA-Gels für eine Reihe von  $\beta$ -Carbolinderivaten. Die durch radioaktive Markierung und charakteristische Laufstrecken identifizierten DNA-Bindungskomplexe sowie die Bande der freien  $^{32}\text{P}$ -markierten DNA sind gekennzeichnet. Für die Verbindungen T 4 (Tetrahydro-Harman) und insbesondere T 3 (Tetrahydro-Norharman) war die Bildung der Protein-DRE-Komplexe deutlich detektierbar. Auch die Inkubation mit den  $\beta$ -Carbolinen Harman und Norharman führte zu einer mäßig starken Komplexbildung, während Pinolin nur eine sehr schwache Komplexbildung hervorrief. Die Ausbildung der charakteristischen Protein-DRE-Komplexbanden beim GRA belegte, dass diese Verbindungen in der Lage sind den Ah Rezeptor zu aktivieren und in seine hoch-affine DNA-Bindungsform zu transformieren. Im Vergleich mit der Positivkontrolle TCDD war diese Fähigkeit jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt.



**Abb. 30:** Untersuchung der ligand-abhängigen Aktivierung des Ah Rezeptors und Transformation des AhR-Ligand-Komplexes zur DNA-Bindungsform durch verschiedene  $\beta$ -Carbolinderivate mittels *in vitro* Gelretardation Assay. Meerschweinchen-Lebercytosol (8 mg Protein/ml) wurde mit DMSO (20  $\mu$ l/ml Endkonzentration), TCDD (20 nM) oder 100  $\mu$ M der aufgeführten  $\beta$ -Carbolinderivate für 2 h bei 20 °C inkubiert. Aliquote wurden mit  $^{32}$ P-DRE-Oligonukleotiden inkubiert und die Proben mittels Gelretardation Assay analysiert.

Da die  $\beta$ -Carboline Harman und Norharman in den Reporteragenbioassays keine AhR-abhängige Genexpression induziert hatten, sondern die durch AhR Agonisten induzierte Genexpression inhibierten, untersuchten wir diese Wirkung auch im *in vitro* Gelretardation Assay. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen an Harman und Norharman zusammen mit dem Agonisten TCDD (20 nM) und Meerschweinchen-Lebercytosol inkubiert. Abbildung 31 zeigt die Phosphoimager-Aufnahme des Elektrophorese-Gels für die Koinkubation von Harman bzw. Norharman mit TCDD im *in vitro* GRA.



**Abb. 31:** Untersuchung der ligand- und dosis-abhängigen Inhibierung von Transformation des Ah Rezeptors und Aktivierung des AhR-Ligand-Komplexes zur DNA-Bindungsform durch die  $\beta$ -Carboline Harman (H) und Norharman (NH) mit Hilfe des *in vitro* Gelretardation Assays. Meerschweinchen-Lebercytosol (8 mg Protein/ml) wurde mit DMSO (20  $\mu$ l/ml Endkonzentration), TCDD (20 nM), 100  $\mu$ M  $\beta$ -Carbolin bzw. in den Koinkubationen mit TCDD (20 nM) und den aufgeführten Konzentrationen der entsprechenden  $\beta$ -Carboline für 2 h bei 20 °C inkubiert. Aliquote wurden mit  $^{32}$ P-DRE-Oligonukleotiden inkubiert und die Proben mittels GRA analysiert.

Die Koinkubationsansätze von Harman und Norharman mit TCDD im Gelretardation Assay demonstrierten, dass mit steigender Konzentration der  $\beta$ -Carboline die Intensität der durch TCDD induzierten Protein-DRE-Komplex-Bande geschwächt wurde (Abb. 31). Harman und Norharman unterdrückten folglich dosis-abhängig die durch den Agonisten TCDD induzierte Aktivierung des Ah Rezeptors und die Ausbildung seiner

hoch-affinen DNA-Bindungsform. Dieser inhibierende Einfluss von Harman und Norharman auf den durch einen Agonisten aktivierten AhR Signaltransduktionsmechanismus wurde auch mit den Reporterassays beschrieben und charakterisiert.

Die Ergebnisse obiger und weiterer Untersuchungen von  $\beta$ -Carbolinen mit dem *in vitro* Gelretardation Assay sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Die Auswertung der Elektrophorese-Gele mit Hilfe des Phosphoimagers ermöglichte neben der graphischen Darstellung der radioaktiven Banden auch die (semi-)quantitative Auswertung der gebildeten Protein-DRE-Komplexe. Die Abschätzung der spezifisch in die induzierten AhR-Ligand-DRE-Komplexe eingebauten Menge an  $^{32}\text{P}$ -DRE erfolgte durch Messung der Menge an Radioaktivität in den induzierten Protein-DNA-Komplexen und Subtraktion der Menge an Radioaktivität, die in derselben Position für die Negativkontrolle DMSO detektiert werden konnte. Die auftretende Differenz zwischen den detektierten Radioaktivitäten für die Negativkontrolle und für die jeweilige Probe repräsentierte somit die Menge an induzierbaren AhR- $^{32}\text{P}$ -DNA-Komplexen und wurde in Relation zur Menge der durch TCDD induzierten spezifischen Komplexe ausgedrückt.

Für  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester,  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-ethylester und  $\beta$ -Carbolin-3-N-methylcarboxamid wurden im *in vitro* GRA mäßige Gehalte an induzierten AhR-Ligand-DRE-Komplexen detektiert. Dies belegte, dass diese Verbindungen den Ah Rezeptor aktivieren und die Transformation in seine hoch-affine DNA-Bindungsform induzieren können. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit denen der Reporterassays, obwohl diese Fähigkeit verglichen mit TCDD schwächer ausgeprägt war. Mit 11,7 % und 8,2 % der durch TCDD induzierten Komplexmenge zeigten Harmin und Harmalin eine deutlich geringere Komplexbildung, die aber ebenfalls gut mit den Ergebnissen der AhR vermittelten Genexpression in den Reporterassays korrelierte.

Die Koinkubationsexperimente mit TCDD ergaben sowohl für Harman und Norharman als auch für Harmin und Harmalin eine deutliche Reduktion der induzierten AhR-DRE-Komplexe und beschrieben somit die Fähigkeit dieser Verbindungen Aktivierung und Transformation des AhR-Ligand-Komplexes in seine DNA-Bindungsform zu inhibieren.

**Tab. 14:** Übersicht der Ergebnisse verschiedener  $\beta$ -Carboline und AhR Liganden im *in vitro* Gelretardation Assay

		Induzierte AhR-Ligand-DRE-Komplexe <sup>a</sup>	Induzierte AhR-Ligand-DRE-Komplexe <sup>b</sup>
TCDD	20 nM	100,0 %	-
BNF	1 $\mu$ M	122,1 %	
$\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester	100 $\mu$ M	21,0 %	-
$\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-ethylester	100 $\mu$ M	28,1 %	-
$\beta$ -Carbolin-3-N-methyl-carboxamid	100 $\mu$ M	36,9 %	-
T 3	100 $\mu$ M	81,4 %	-
T 4	100 $\mu$ M	48,5 %	-
L-Tryptophan	200 $\mu$ M	15,5 %	-
Harman	100 $\mu$ M	18,4 %	64,1 %
	10 $\mu$ M	n.b.	77,0 %
	1 $\mu$ M	n.b.	90,9 %
Norharman	100 $\mu$ M	29,2 %	58,7 %
	10 $\mu$ M	n.b.	86,9 %
	1 $\mu$ M	n.b.	92,2 %
Harmalin	100 $\mu$ M	8,2 %	25,1 %
Harmin	100 $\mu$ M	11,7 %	52,6 %

**a:** Angabe der Menge an induzierten AhR-Ligand-<sup>32</sup>P-DRE-Komplexen bezogen auf die durch 20 nM TCDD induzierte Komplexmenge (ermittelt über Messung im Phosphoimager).

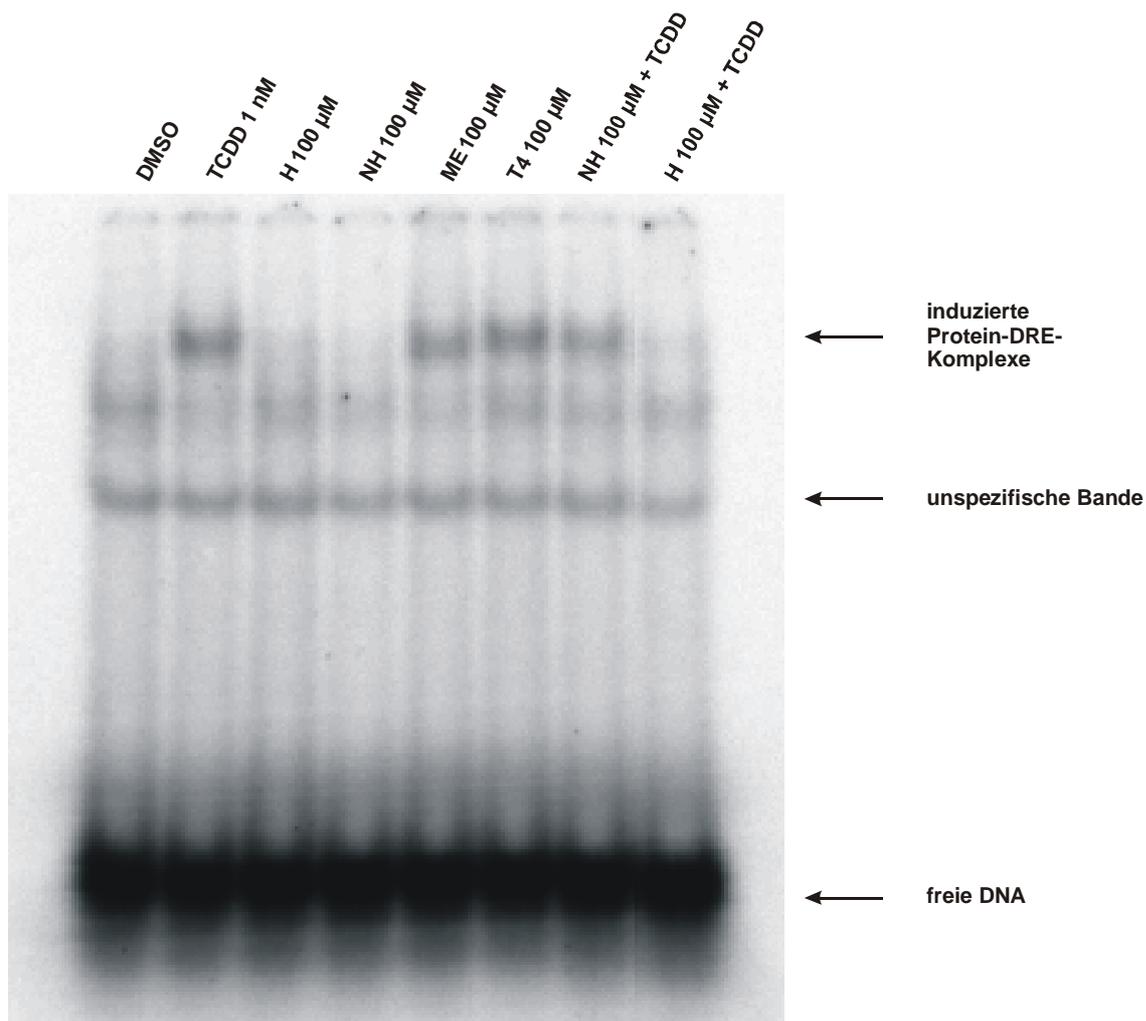
**b:** Koinkubation von TCDD (20 nM) mit der jeweils angegebenen Konzentration der Testsubstanz; Angabe der Menge der detektierten AhR-Ligand-<sup>32</sup>P-DRE-Komplexe bezogen auf die durch 20 nM TCDD induzierte Komplexmenge (ermittelt über Messung im Phosphoimager).

### 4.3 GRA mit Zellkernextrakten

Beim *in vitro* Gelretardation Assay mit Meerschweinchen-Lebercytosol wurden die AhR-Ligand-Komplexe mit hoher Affinität zur DNA durch Inkubation der Testsubstanzen mit Cytosol als AhR-Quelle „erzeugt“. Dies erlaubt die Messung der Ausbildung von AhR-Ligand-Komplexen, erbringt aber nicht den Nachweis des Transports der AhR-Ligand-Komplexe in den Zellkern. Die Variante des *ex vivo* Gelretardation Assays basiert auf der Isolierung der entsprechenden Proteine aus den Zellkernen von Zellen nach Inkubation mit den Testsubstanzen. Dazu wurden Hepa-Zellen in Kultur mit TCDD als Positivkontrolle, DMSO als Negativkontrolle bzw. mit den zu testenden Verbindungen inkubiert und im Anschluss die Zellkernproteine, die auch die zur DNA hoch-affinen AhR-Ligand-Komplexe enthielten, extrahiert. Nach erfolgter Aufreinigung der Zellkernextrakte wurden diese mit  $^{32}\text{P}$ -markierten DRE-Oligonukleotiden inkubiert und die Proben wie beim *in vitro* GRA elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Phosphoimager-Aufnahme des Elektrophorese-Gels (Abb. 32) lässt erkennen, dass sowohl TCDD, als auch  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester und Tetrahydro-Harman (T 4) eine deutlich erkennbare Protein-DRE-Komplex-Bande ausbildeten und somit die Transformation des Ah Rezeptors in seine hoch-affine DNA-Bindungsform induzierten. Im Gegensatz dazu zeigten die  $\beta$ -Carboline Harman und Norharman keine Komplexbildung. Sie konnten demzufolge die Aktivierung und Transformation des Ah Rezeptors nicht hervorrufen. Diese Beobachtung mit Hilfe der *ex vivo* Zellkernextrakte steht in Widerspruch zu den Ergebnissen des *in vitro* GRA mit Meerschweinchen-Lebercytosol: Dieser demonstrierte, dass Harman und Norharman prinzipiell in der Lage sind die Aktivierung und Transformation des AhR zu induzieren.

Bei den Koinkubationsuntersuchungen von Harman und Norharman in Gegenwart von TCDD bewirkten diese Verbindungen im *ex vivo* GRA erwartungsgemäß eine deutliche Schwächung der durch TCDD induzierten Protein-DRE-Komplexbanden und unterdrückten also die Ausbildung der hoch-affinen DNA-Bindungsform der AhR-TCDD-Komplexe (Abb. 32).



**Abb. 32:** Untersuchung der liganden-abhängigen AhR Aktivierung und Transformation des AhR-Ligand-Komplexes in die DNA-Bindungsform durch verschiedene  $\beta$ -Carbolinderivate mittels *ex vivo* Gelretardation Assay sowie Untersuchung der Inhibierung dieser durch TCDD induzierbaren Prozesse durch  $\beta$ -Carboline. Aliquote der durch Inkubation von kultivierten Hepa-Zellen mit DMSO, 1 nM TCDD, Harman (H), Norharman (NH), Tetrahydro-Harman (T4),  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester (ME) (jeweils 100  $\mu$ M) bzw. Aliquote der durch Koinkubation von TCDD (1 nM) mit den entsprechenden  $\beta$ -Carbolinen gewonnenen Zellkernextrakte wurden mit  $^{32}$ P-DRE-Oligonukleotiden inkubiert und die Proben mittels Gelretardation Assay analysiert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse des *ex vivo* GRA in Einklang mit den Resultaten der Reporterassays stehen. Diese hatten übereinstimmend gezeigt, dass Harman und Norharman die AhR vermittelte Genexpression

nicht induzieren konnten, aber fähig waren die durch TCDD bzw. BNF induzierte Genexpression zu inhibieren.

#### 4.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Zur weiteren Charakterisierung des AhR Ligandenpotentials verschiedener  $\beta$ -Carboline untersuchten wir in DNA-Bindungsassays (Gelretardation Assay, GRA) die Fähigkeit dieser Verbindungen die ligand-abhängige Aktivierung des Ah Rezeptors und die Transformation des AhR-Ligand-Komplexes zur DNA-Bindungsform zu stimulieren. Dabei setzten wir im *in vitro* GRA Meerschweinchen-Lebercytosol als AhR Quelle ein, während wir im *ex vivo* GRA die AhR-Ligand-Komplexe durch Inkubation kultivierter Zellen und Extraktion der Zellkernproteine gewannen.

Aufgrund des beschriebenen AhR Signaltransduktionsmechanismus (vgl. Abb. 2) wird angenommen, dass die Fähigkeit von Substanzen den Ah Rezeptor in seine DNA-Bindungsform zu transformieren sehr gut mit ihrer Fähigkeit die AhR-abhängige Genexpression in intakten Zellen zu induzieren korreliert. Für die  $\beta$ -Carboline Harman und Norharman war dies beim *ex vivo* GRA und den Reporteragenassays der Fall, während beim Vergleich der Ergebnisse mit denen des *in vitro* GRA eine Diskrepanz auftrat. So bestand zwischen den Ergebnissen des *ex vivo* GRA und der *in vivo* Reporteragenassays eine sehr gute Korrelation, da Harman und Norharman in diesen Fällen weder den Ah Rezeptor in seine hoch-affine DNA-Bindungsform überführten, noch die AhR-abhängige Reporteragenexpression induzierten und darüber hinaus auch die durch AhR Agonisten induzierten Effekte dosis-abhängig inhibierten. Im Gegensatz dazu induzierten Harman und Norharman in den Ansätzen des *in vitro* Gelretardation Assays die AhR-DRE-Komplexbildung mit 18,4 % bzw. 29,2 %, bezogen auf die Wirkung von TCDD, und lagen damit im Bereich der Agonisten  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäuremethylester und -ethylester,  $\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-N-methylamid, sowie von Tryptophan (vgl. Tab. 14). Während Harman und Norharman also in den „*in vivo*“ Bioassays ausschließlich antagonistische Effekte hervorriefen, konnten sie in den Ansätzen des *in vitro* GRA die Aktivierung des Ah Rezeptors und Transformation zu AhR-Ligand-Komplexen mit hoher Affinität zur DNA auslösen (vgl. Abb. 31 und

32). Sie zeigten so neben dem antagonistischen auch ein deutliches agonistisches Potential. Werden die Ergebnisse des *in vitro* GRA somit isoliert betrachtet, lässt dies den Schluss zu, dass Harman und Norharman als partielle Agonisten wirken können.

Die für die  $\beta$ -Carboline Harman und Norharman beobachtete Diskrepanz zwischen den Ergebnissen des *in vitro* Gelretardation Assays einerseits und den Ergebnissen des *ex vivo* Gelretardation Assays und der Reporteragenassays andererseits, kann auch mit verschiedenen Eigenheiten der verwendeten Assays erklärt werden:

Da diese sich hinsichtlich der zugrunde liegenden Tierart unterscheiden, besteht die Möglichkeit, dass Harman und Norharman partielle Agonisten (mit antagonistischem Potential) des Meerschweinchen Ah Rezeptors (*in vitro* GRA) und Antagonisten des Maus Ah Rezeptors (*ex vivo* GRA und Reporteragenassays) darstellen. Das Auftreten spezies-spezifischer Unterschiede ist bereits seit langem bekannt und äußert sich primär in der variablen toxischen Wirkung von TCDD. So unterscheiden sich die LD<sub>50</sub>-Werte zwischen der empfindlichsten Tierart, dem Meerschweinchen, und der Maus um den Faktor 100, sowie zwischen Meerschweinchen und Hamster (als unempfindlichste Tierart) um den Faktor 1000. Die hierfür zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind nicht vollständig aufgeklärt, es wird jedoch der Einfluss von Unterschieden bei den Ligandenbindungsaffinitäten und bei Prozessen wie Translokation in den Zellkern, DRE-Bindung und gen-spezifische Transaktivierung diskutiert (Ema et al., 1994; Abnet et al., 1999). Auch spezies-spezifische Abweichungen in der Aminosäuresequenz des Ah Rezeptors und damit verbundene Konformationsänderungen, z. B. in der Transaktivierungs- oder Ligandenbindungsdomäne, können die Interaktion von Liganden mit dem AhR beeinflussen (Ema et al., 1994; Korkalainen et al., 2001).

Zhou und Mitarbeiter (2003) beobachteten bei der Untersuchung verschiedener synthetischer Flavonoide, dass das 3'-Methoxy-4'-nitroflavon (MNF) im GRA mit Mauslebercytosol die TCDD-induzierte AhR-DRE-Komplexbildung inhibierte, während beim GRA mit Meerschweinchen-Lebercytosol neben dieser antagonistischen Aktivität zusätzlich eine agonistische Aktivität auftrat. Analoge Effekte wurden auch bei AhR-abhängigen Luciferase-Reportersystemen beobachtet, die auf Maus- bzw. Meerschweinchenzellen basierten. Zhou und Mitarbeiter ordneten MNF als einen puren

Antagonisten in Mauszellen und als einen partiellen Agonisten mit antagonistischem Potential in Meerschweinchenzellen ein. Sie führten das unterschiedliche Verhalten darauf zurück, dass MNF eine sehr viel geringere Effizienz zur Transformation des Maus-AhR gegenüber dem Meerschweinchen-AhR aufweist. Unsere Ergebnisse aus den GRA und Reporteragenassays lassen für die  $\beta$ -Carboline Harman und Norharman analoge Schlüsse zu: Harman und Norharman zeigten im Luciferase-Reporteragenassay und im *ex vivo* Gelretardation Assay, die beide auf Mauszellen basieren, ausschließlich antagonistische Effekte. Dahingegen waren beim *in vitro* Gelretardation Assay mit Meerschweinchencytosol sowohl agonistische, als auch antagonistische Effekte beobachtbar. Diese Unterschiede in der AhR Ligandenaktivität von Harman und Norharman in den Bioassays könnten somit ebenfalls spezies-spezifisch bedingt sein.

Neben der möglichen Spezies-Abhängigkeit könnten die beobachteten Effekte auch in Zusammenhang mit der unterschiedlichen Zugänglichkeit der Testsubstanzen zum Ah Rezeptor stehen. Während bei den *in vitro* Inkubationsbedingungen mit Cytosol die Testverbindungen einen direkten Zugang zum AhR haben, müssen diese in den zellbasierten Assays vor der Bindung an den AhR zunächst biologische Membransysteme effektiv überwinden. Auch das „Abfangen“ von Testsubstanzmolekülen durch Serumproteine und -lipide kann zu einer schwächeren bzw. nicht vorhandenen agonistischen Response im *ex vivo* GRA und in den Reporteragenassays beitragen. Auch im Fall der  $\beta$ -Carboline Harman und Norharman kann diese bessere Zugänglichkeit für die Ausbildung der AhR-DRE-Komplexe im *in vitro* GRA verantwortlich sein, während bei den zellbasierten Assays keine für agonistische Wirkungen ausreichende Konzentration in den Zellen aufgebaut werden konnte.

Ein weiterer Aspekt, der für die Unterschiede zwischen den Assays berücksichtigt werden muss, ist der mögliche Einfluss von Metabolismusprozessen auf die Testsubstanzen. In den *in vivo* Bioassays, die auf „lebenden (Zell-)Systemen“ beruhen, wie die Reporteragenassays und der *ex vivo* Gelretardation Assay, ist es prinzipiell möglich, dass nicht die Testsubstanz selbst, sondern ein oder mehrere Metabolite dieser Testsubstanz für die beobachteten Effekte verantwortlich sind. Im konkreten Fall erscheint eine Metabolisierung von Harman und Norharman zu Verbindungen mit antagonistischem AhR Ligandenpotential in den „*in vivo*“ Assays jedoch unwahr-

scheinlich, da bei den kurzen Inkubationszeiten von z. B. einer Stunde im *ex vivo* Gelretardation Assay der Einfluss von Metabolisierungsvorgängen vernachlässigbar ist.

Der Gelretardation Assay ist zwar eine empfindliche Methode um AhR Liganden zu detektieren, er beschreibt aber lediglich die Fähigkeit von Chemikalien den Ah Rezeptor zu aktivieren und den AhR-Ligand-Komplex in seine hoch-affine DNA-Bindungsform zu transformieren. Gelretardation Assays erlauben daher keine Aussagen, ob diese Verbindungen auch die anschließende Genexpression induzieren. Da Untersuchungen von potentiellen AhR Liganden ausschließlich mit Hilfe des *in vitro* GRA zur Identifizierung von falsch positiven Proben führen können, schränkt dies die Zweckmäßigkeit des *in vitro* GRA als Screeningassay zur Detektion von AhR Liganden ein. Auch der Einsatz von Zellkernextrakten (*ex vivo* GRA) liefert keine Aussagen über eine mögliche Genexpression. Da in diesem Fall aber die zur DNA affinen AhR-Ligand-Komplexe aus den Zellkernen von Zellen nach Inkubation mit Testsubstanzen isoliert werden, spiegelt diese Methode die Bedingungen im lebenden (Zell-)System besser wider. Im Gegensatz zu den Gelretardation Assays beschreiben die Reporterassays die Fähigkeit einer Chemikalie in die Zellen einzudringen, zelluläre Metabolismusvorgänge zu überstehen und die Genexpression zu induzieren. Sie decken damit den Ablauf des gesamten AhR Signaltransduktionsmechanismus ab. Allerdings belegen sie nicht unmittelbar die Bindung einer Chemikalie an den Ah Rezeptor und die AhR-Abhängigkeit der zellulären Antwort.

Insgesamt besitzen die verschiedenen *in vivo* Assays hinsichtlich Detektion und Charakterisierung von AhR Agonisten und Antagonisten eine höhere Aussagekraft als der *in vitro* GRA, da hier die Bedingungen im intakten Zellsystem am Besten widergespiegelt werden. Doch erst die Kombination der verschiedenen methodischen Ansätze erlaubt es, die Aussagen zur AhR-abhängigen Genexpression in intakten Zellen mit den Informationen zur Aktivierung und Transformation des Ah Rezeptor zu verbinden, die AhR-Abhängigkeit der zellulären Antwort zu bestätigen und Einblicke in Einzelschritte des AhR Signaltransduktionsmechanismus zu gewinnen.

Zusammenfassend zeigten unsere Ergebnisse der *in vitro* und *ex vivo* Gelretardation Assays sowie der Reporterassays, dass die  $\beta$ -Carboline Tetrahydro-Harman (T 4),

---

$\beta$ -Carbolin-3-carbonsäure-methylester und -ethylester die Transformation der entsprechenden AhR-Ligand-Komplexe und die AhR-abhängige Genexpression induzierten. Diese Verbindungen sind somit als Agonisten des Ah Rezeptors einzuordnen. Die  $\beta$ -Carboline Harman und Norharman wiesen in allen Assays übereinstimmend ein ausgeprägtes antagonistisches Potential auf, da sie sowohl die durch TCDD stimulierte AhR Transformation, als auch die Genexpression inhibierten. Die durchgeführten GRA-Experimente ermöglichten die Schlussfolgerung, dass die antagonistischen Effekte im AhR Signalweg bereits beim Schritt der AhR Transformation und DNA-Bindung stattfanden und nicht auf eine fehlerhafte oder unterbundene Transkription der DRE-kontrollierten Gene zurückzuführen waren.

## **5 Screening von Lebensmitteln auf ihre AhR Ligandenaktivität**

### **5.1 Einführung**

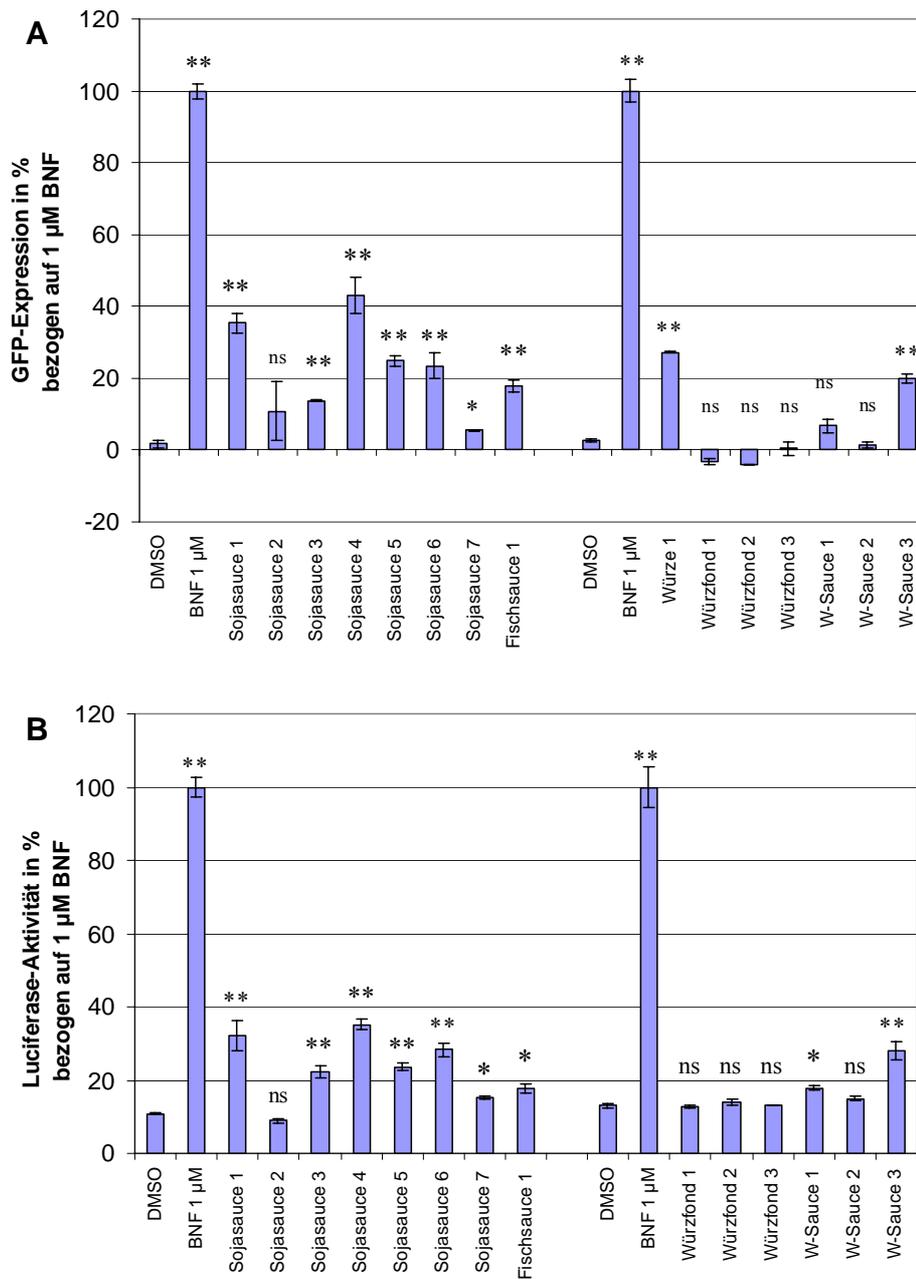
Fremdstoffe (Xenobiotika) können über verschiedene Wege in den Körper gelangen. Neben der Aufnahme über die Lunge und die Haut spielt insbesondere die Resorption über den Magen-Darm-Trakt (Ingestion) eine wichtige Rolle. Daher gilt die Nahrung als eine der bedeutendsten Quellen zur Aufnahme von Fremdstoffen exogenen oder natürlichen Ursprungs durch den Menschen. Lebensmittel können dabei, abhängig von Art und Herkunft, mit Schadstoffen und Kontaminanten belastet sein. Daneben gelangt über die Nahrung aber auch eine Vielzahl natürlicher Nahrungsmittelbestandteile in den menschlichen Körper. Diese umfassen sowohl natürliche Inhaltsstoffe, als auch bei der Zubereitung entstehende Verbindungen (Dekant und Vamvakas, 2005). Die Nahrung stellt somit auch eine wichtige Quelle für AhR Liganden natürlichen Ursprungs dar. Die bisher identifizierten natürlichen AhR Liganden zeigten in verschiedenen AhR-abhängigen Bioassays zwar eine deutlich geringere Wirkstärke als die klassischen AhR Liganden, insbesondere TCDD, doch ist der Mensch diesen natürlichen Verbindungen über die Nahrung kontinuierlich ausgesetzt.

Ausgehend von den in der Literatur beschriebenen natürlichen AhR Liganden (vgl. Abschnitt B 2.3) und von unseren eigenen Ergebnissen zur Identifizierung von  $\beta$ -Carbolinderivaten als AhR Liganden (vgl. Abschnitt C 3 und 4) wählten wir verschiedene Soja- und Würzsaucen zur Untersuchung ihrer AhR Ligandenaktivität aus. Da Sojabohnen den Grundstoff für die Soja- und Würzsaucen darstellen, zeichnen sich diese durch hohe Gehalte an Tryptophan und den davon abgeleiteten Tetrahydro- $\beta$ -Carbolinen und  $\beta$ -Carbolinen aus (vgl. Abschnitt B 5) und ließen somit positive Wirkungen in den eingesetzten Bioassays erwarten.

## 5.2 Screening von Soja- und Würzsaucen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Soja- und Würzsaucen als Modelllebensmittel auf ihre AhR Ligandenaktivitäten hin untersucht. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung von Lebensmitteln und der Vielzahl und Vielfalt an (potentiell) AhR-aktivierenden bzw. AhR-inhibierenden Faktoren ist es nur bedingt möglich auf die Wirkung eines Lebensmittels in seiner Gesamtheit zu schließen. Daneben liegen bisher nur wenige Untersuchungen zur AhR Aktivierung von Lebensmitteln bzw. durch deren Extrakte, wie z. B. Gemüse-, Früchte-, Kräuter- und Teeextrakte, vor (Amakura et al., 2002; Jeuken et al., 2003; Palermo et al., 2003). Um die Effekte von Lebensmitteln auf den AhR vermittelten Transkriptionsweg zu untersuchen, haben wir verschiedene Würz- und Sojasaucen aus dem Handel getestet. Obwohl sie, zumindest in Europa, nicht in großen Mengen konsumiert werden, sind sie als Modellsysteme für komplexe Lebensmittel sehr gut geeignet. Zum Screening auf agonistische bzw. antagonistische Aktivität mittels der etablierten Bioassays wurden die Proben direkt, nach dem Abzentrifugieren von Trübstoffen, mit dem Zellkulturmedium vermischt und mit den H1G1.1c3 bzw. den H1L6.1c2 Zellen inkubiert.

Abbildung 33 zeigt die Ergebnisse des Screenings verschiedener Soja- und Würzsaucen, die mittels der Reporteragenassays auf ihre Fähigkeit zur Induktion der AhR vermittelten Genexpression untersucht wurden. Die relative Stärke der durch die verschiedenen Lebensmittelproben induzierten Reporterproteinexpression wurde durch 1  $\mu$ M BNF als Bezugssystem und Positivkontrolle ausgedrückt. Eine signifikante Steigerung der EGFP-Genexpression gegenüber der als Negativkontrolle mitgeführten DMSO-Probe wurde für sechs der sieben getesteten Sojasaucen sowie für die Proben „Fischsauce“, „Würze 1“ und „Worcestersauce 3“ (W-Sauce 3) detektiert, während die Proben „Sojasauce 2“, „Worcestersauce 1“, „Worcestersauce 2“ (W-Saucen 1 und 2), und alle untersuchten Würzfonds zu keiner signifikanten Reporterexpression führten. Die aktivste Probe „Sojasauce 4“ rief eine Induktion von 43 % bezogen auf die Wirkung von 1  $\mu$ M BNF hervor. Für die Untersuchung dieser Lebensmittelproben ergaben sich im Luciferase-Reporteragenassay analoge Genexpressionsprofile.

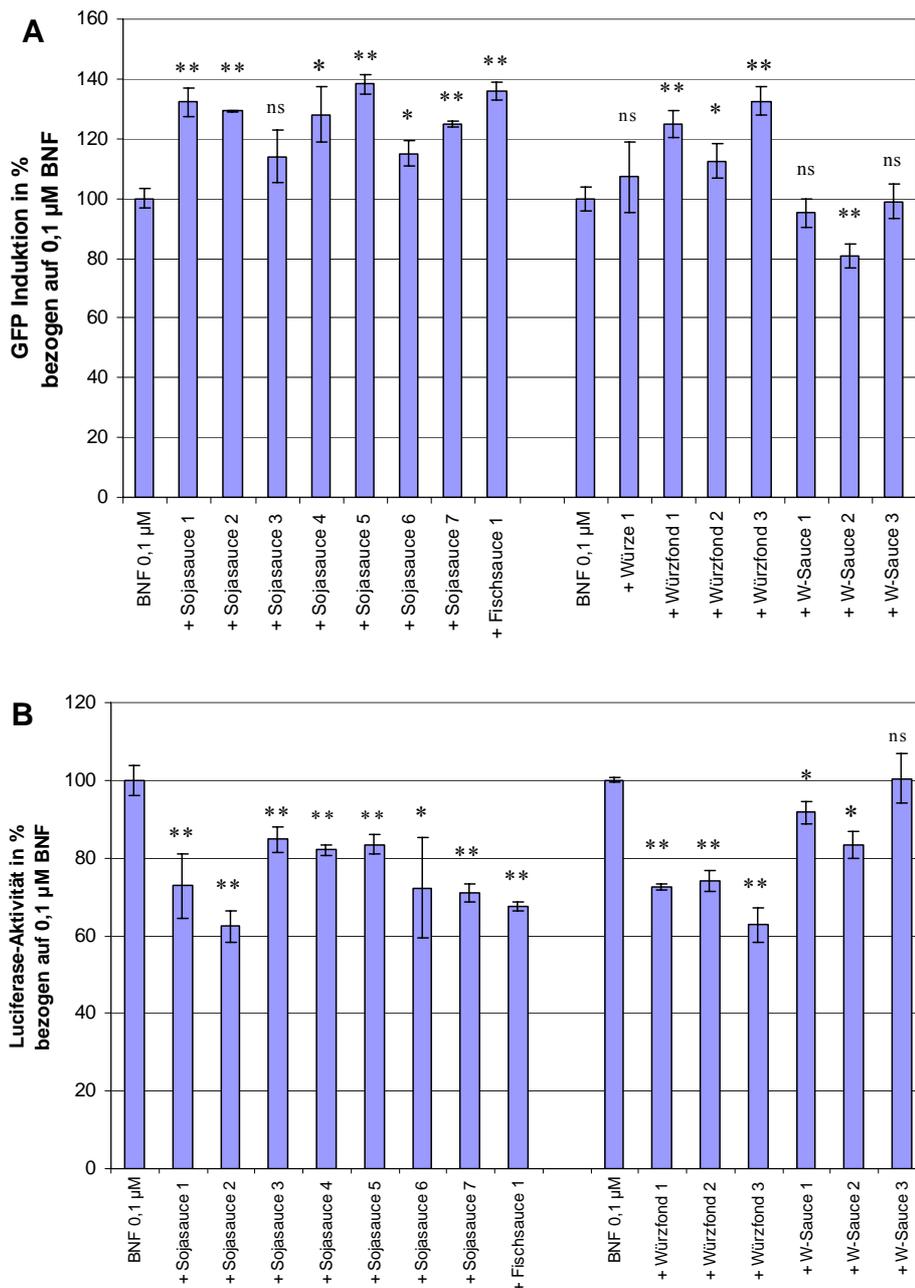


**Abb. 33:** Screening auf agonistische Eigenschaften von Soja- und Würzsaucen durch direkte Inkubation der Proben mit H1G1.1c3 Zellen (EGFP-Assay) (A) bzw. mit H1L6.1c2 Zellen (Luciferase-Assay) (B). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei Bestimmungen. Proben, die signifikant größer sind als die DMSO-Negativkontrolle bei  $P < 0,05$  (\*) oder  $P < 0,01$  (\*\*) (bestimmt mittels Student's t-Test) sind gekennzeichnet. Die Aktivitäten sind als relative Induktion bezogen auf 1 µM BNF als Positivkontrolle dargestellt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten somit sowohl im EGFP-Assay, als auch im Luciferase-Assay (Abb. 33), dass die Inkubation der entsprechenden Hepa-Zellen bei mehreren Proben, vorwiegend den Sojasaucen, zu einer signifikanten Steigerung der Expression des jeweiligen Reporterproteins führte. Diese Proben können somit als natürliche Quellen für (noch näher zu charakterisierende) natürliche AhR Agonisten angesehen werden. Für Proben, die nicht zu einer signifikanten Reporterexpression führten, wird angenommen, dass diese Lebensmittel keine oder nicht in ausreichender Konzentration AhR Agonisten enthalten, um unter den gewählten experimentellen Bedingungen eine Genexpression zu induzieren.

Das Screening auf eine mögliche antagonistische Aktivität (Abb. 34) der Soja- und Würzsaucen erfolgte durch Koinkubation der Probenlösungen mit 0,1  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Naphthoflavon (BNF) als Induktor der AhR vermittelten Genexpression, um eine möglichst maximale Reporterexpression ohne gleichzeitige Übersättigung der in den Zellen vorliegenden Rezeptoren zu erreichen. Wie in Abb. 34 (A) zu erkennen ist, führte die Inkubation verschiedener Soja- und Würzsaucen zu einer signifikanten Steigerung der EGFP-Expression gegenüber der separat mitgeführten Kontrolle 0,1  $\mu\text{M}$  BNF. Diese Proben zeigten somit keine antagonistischen d. h. inhibitorischen Effekte, sondern wiesen additive, im Fall der Würzfonds sogar synergistische Effekte auf. Eine Reduktion der durch BNF induzierten Genexpression und eine somit antagonistische Wirkung war nur bei der Probe „Worcestersauce 2“ (W-Sauce 2) zu beobachten.

Hingegen waren beim Screening auf antagonistische Eigenschaften im Luciferase-Assay (Abb. 34 B) bei allen Proben, mit Ausnahme von „W-Sauce 3“, inhibitorische Effekte erkennbar. Der ausgeprägteste inhibitorische Effekt trat bei Probe „Sojasauce 2“ auf, die die durch 0,1  $\mu\text{M}$  BNF induzierte Luciferase-Reporterproteinexpression auf 62 % abschwächte. Dies bedeutet, dass in diesen Lebensmittelproben vorliegende Inhaltsstoffe in der Lage waren bei Koinkubation mit einem starken Agonisten, die durch diesen Agonisten ausgelöste Genexpression zu antagonisieren. Gleichzeitig waren Inhaltsstoffe auch fähig als schwache Agonisten zu wirken (Abb. 33).



**Abb. 34:** Screening auf antagonistische Eigenschaften von Soja- und Würzsaucen durch direkte Inkubation der Proben mit H1G1.1c3 Zellen (EGFP-Assay) (A) bzw. mit H1L6.1c2 Zellen (Luciferase-Assay) (B) in Gegenwart von 0,1  $\mu$ M BNF. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei Bestimmungen. Proben, die sich signifikant von der Referenz 0,1  $\mu$ M BNF bei  $P < 0,05$  (\*) oder  $P < 0,01$  (\*\*) (bestimmt mittels Student's t-Test) unterscheiden sind gekennzeichnet. Die Aktivitäten sind als relative Induktion bezogen auf 0,1  $\mu$ M BNF dargestellt.

Bei der Interpretation der beobachteten Effekte ist zu berücksichtigen, dass AhR Liganden und „Nicht-Liganden“ in den Zellen Metabolisierungsprozessen unterworfen sein können, die von Art und Struktur der Substanzen und somit auch von deren Verweildauer in der Zelle abhängen. Zwar wurden beide Assays vom gleichen Zelltyp (Hepal1c7) abgeleitet, was exakt gleiche Bedingungen bei der Aufnahme der Proben in die Zellen und beim Mechanismus der AhR vermittelten Genexpression gewährleistet, aufgrund der unterschiedlichen Stabilität und Detektionsgrenzen der induzierten Reporterproteine unterscheiden sich die experimentellen Bedingungen jedoch hinsichtlich der Inkubationsdauer. Während der relativ langen Inkubationszeit von 24 Stunden beim EGFP-Assay, gegenüber der nur vierstündigen Inkubation beim Luciferase-Assay, können Probeninhaltsstoffe von zellulären biotransformierenden Enzymen umgesetzt werden und somit umfangreichen Metabolismusprozessen unterworfen sein.

Für die Unterschiede beim Screening auf antagonistische Ligandenaktivität zwischen den beiden zellbasierten Reporterassays ist vermutlich die durch Metabolisierung von Inhaltsstoffen veränderte Zusammensetzung der Proben, bedingt durch unterschiedlich lange Inkubationszeiten, verantwortlich: Wie in Abb. 34 (B) zu erkennen ist, riefen die getesteten Lebensmittelproben, insbesondere die Sojasaucen, beim Screening auf antagonistische Ligandenaktivität im Luciferase-Assay eine Reduktion der induzierten Luciferase-Expression hervor und inhibierten somit die Wirkung des Agonisten  $\beta$ -Naphthoflavon. Aufgrund der relativ kurzen Inkubationszeit ist beim Luciferase-Assay eine metabolische Veränderung der Probeninhaltsstoffe vernachlässigbar. Aus den Ergebnissen des Luciferase-Assays kann somit geschlossen werden, dass in den untersuchten Lebensmittelproben, die eine komplexe Mischung aus AhR Agonisten und Antagonisten darstellen, unter diesen gewählten experimentellen Bedingungen antagonistische Effekte überwiegen.

Im Gegensatz dazu führte die Inkubation verschiedener Soja- und Würzsaucen beim Screening auf antagonistische Ligandenaktivität im EGFP-Assay zu einer signifikanten Steigerung der EGFP-Expression. Es kann angenommen werden, dass während der relativ langen Inkubationszeit antagonistisch wirksame Probeninhaltsstoffe durch Metabolisierung aus den Zellen entfernt bzw. „deaktiviert“ werden, sodass diese nicht

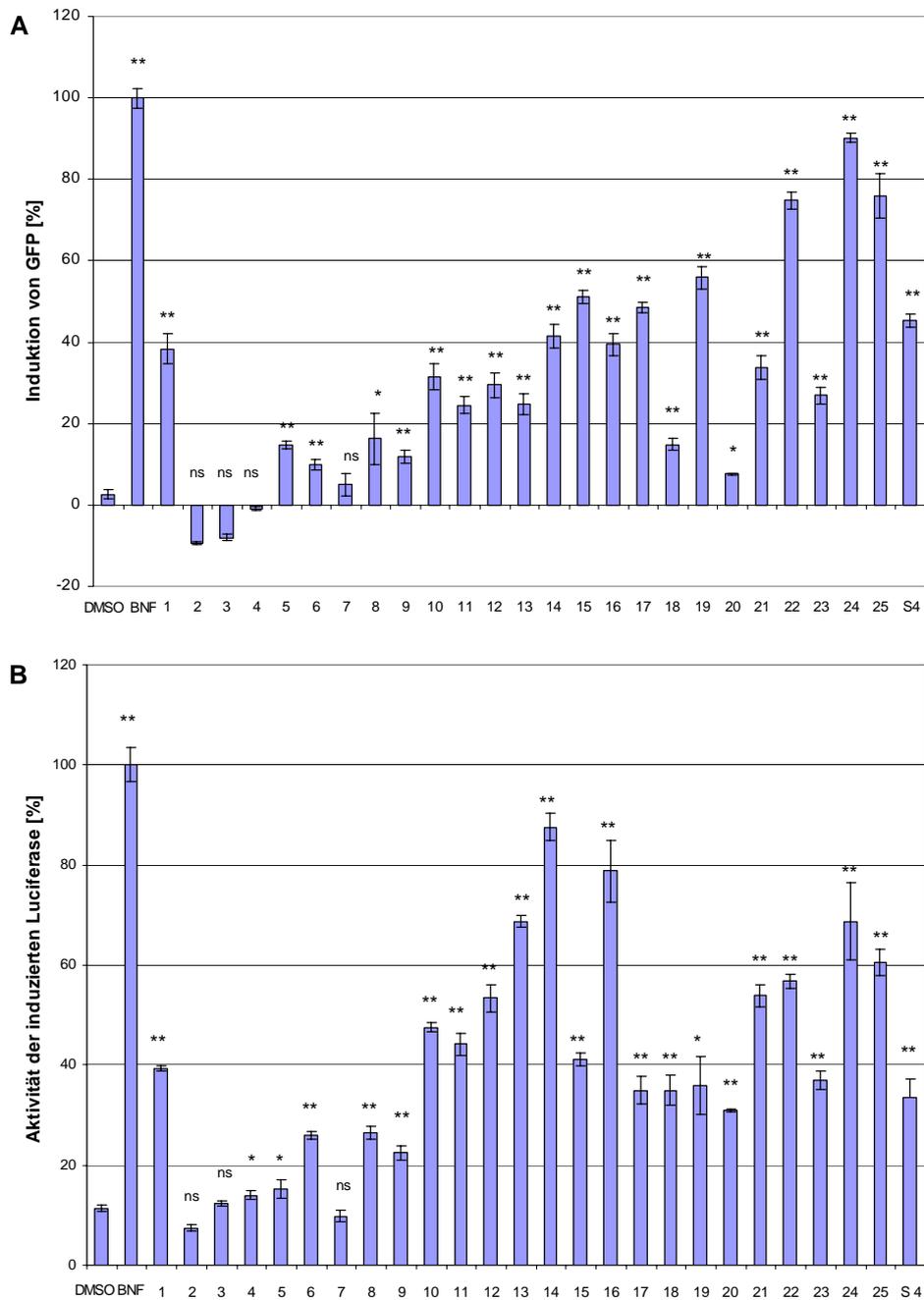
mehr mit dem Ah Rezeptor wechselwirken können und somit agonistische Effekte überwiegen.

Unter Einbeziehung der beim Screening auf agonistische AhR Ligandenaktivitäten durch die Lebensmittelproben ausgelösten agonistischen Response spiegeln die Ergebnisse die Gesamtheit der in den Proben vorkommenden agonistischen und antagonistischen Aktivitäten wider und geben einen ersten Einblick in das Wechselspiel von AhR Liganden in komplexen Mischungen.

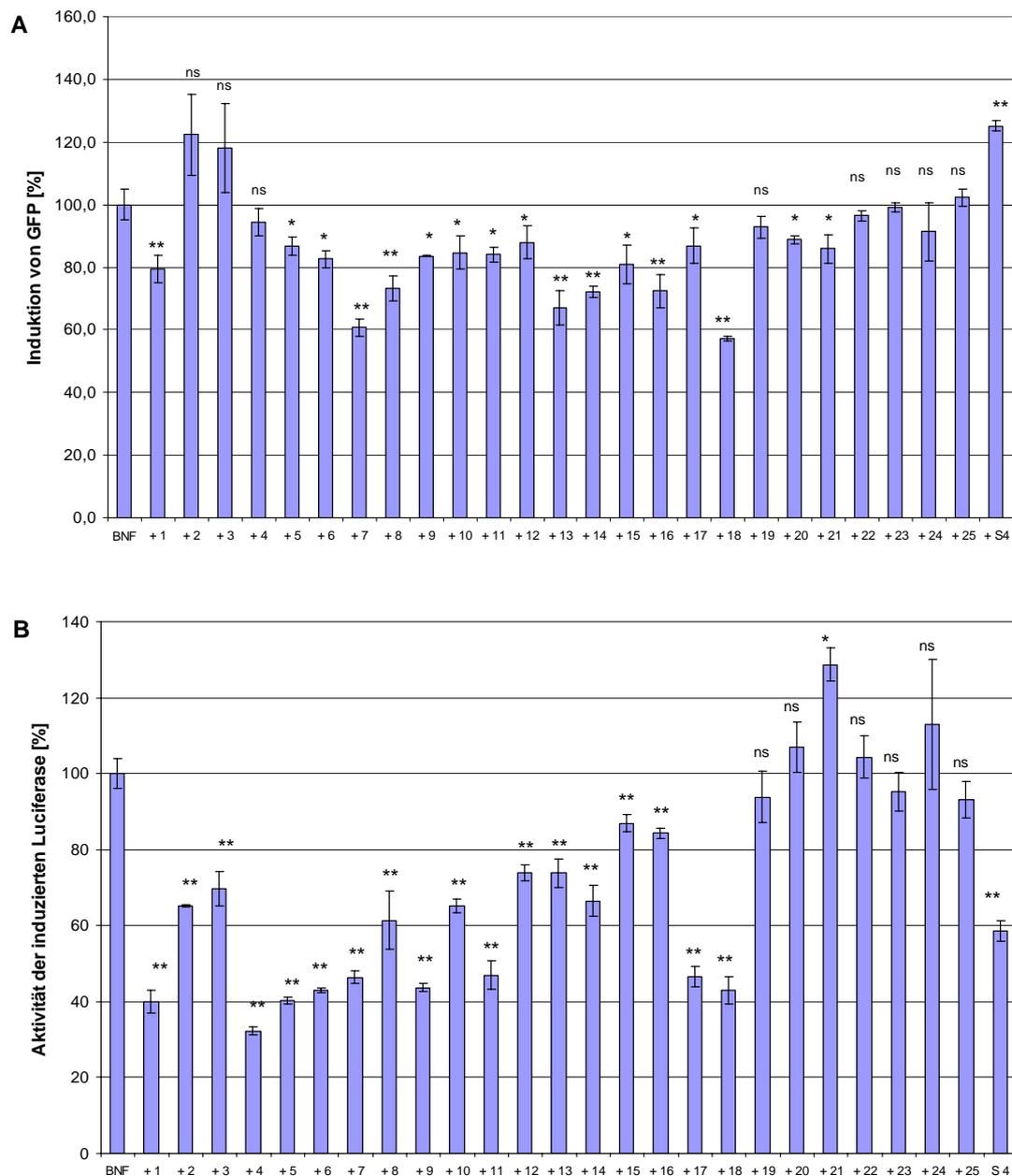
### **5.3 Screening einer fraktionierten Sojasauce**

Zur weiteren Klärung der Frage, welche Anteile der untersuchten Soja- und Würzsaucen für die beobachteten agonistischen und antagonistischen Effekte verantwortlich sind, wurde die im Screening auf agonistische Ligandenaktivität aktive Probe „Sojasauce 4“ mittels präparativer Säulenchromatographie über RP-18 Material in Fraktionen unterschiedlicher Polarität aufgetrennt. Die durch Elution mit einem Acetonitril-Wasser-Gradienten erhaltenen Fraktionen wurden über Fliessinjektionsanalyse mit massenspektrometrischer Detektion auf ihre Hauptkomponenten hin untersucht, Fraktionen mit gleichen Hauptkomponenten vereinigt und mittels der Reporterassays auf ihr AhR Ligandenpotential getestet.

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse für die nicht-fraktionierte Sojasauce und für die Fraktionen in den Reporterassays zu gewährleisten, wurde für alle Proben eine einheitliche Konzentration an Sojasauce Trockenmasse (TM) pro Well eingesetzt. Die in den Diagrammen von Abbildung 35 und 36 angegebenen Aktivitäten beziehen sich auf  $0,35 \text{ mg} \pm 0,09 \text{ mg TM/Well}$ . Daneben wurde auch die nicht-fraktionierte Sojasauce 4 (S 4) in allen Ansätzen in dieser Konzentration mitgeführt und die relativen Aktivitäten durch das Bezugssystem  $\beta$ -Naphthoflavon ausgedrückt.



**Abb. 35:** Screening auf agonistische Eigenschaften von 25 Fraktionen der Sojasauce S 4 durch Inkubation mit H1G1.1c3 (EGFP-Assay) (A) bzw. H1L6.1c2 Zellen (Luciferase-Assay) (B). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei Bestimmungen. Proben, die signifikant größer sind als DMSO-Negativkontrolle bei  $P < 0,05$  (\*) oder  $P < 0,01$  (\*\*) (bestimmt mittels Student's t-Test) sind gekennzeichnet. Die Aktivitäten sind als relative Induktion bezogen auf 1  $\mu$ M BNF als Positivkontrolle dargestellt.



**Abb. 36:** Screening auf antagonistische Eigenschaften von 25 Fraktionen der Soja-sauce S 4 durch Inkubation mit H1G1.1c3 Zellen (EGFP-Assay) (A) bzw. mit H1L6.1c2 Zellen (Luciferase-Assay) (B) in Gegenwart von 0,1  $\mu$ M BNF. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei Bestimmungen. Proben, die sich signifikant von der Referenz 0,1  $\mu$ M BNF bei  $P < 0,05$  (\*) oder  $P < 0,01$  (\*\*) (bestimmt mittels Student's t-Test) unterscheiden sind gekennzeichnet. Die Aktivitäten sind als relative Induktion bezogen auf 0,1  $\mu$ M BNF dargestellt.

Bei unseren Untersuchungen zu den agonistischen und antagonistischen Ligandeneigenschaften der fraktionierten Sojasauce „S 4“ zeigte sich eine Verteilung der Aktivitäten auf unterschiedliche Fraktionen.

Beim Screening auf agonistische Ligandenaktivität (Abb. 35) war auffällig, dass in beiden Assays neben sehr aktiven Fraktionen im Bereich der mittelpolaren und unpolaren Fraktionen (10-18 bzw. 19-25) auch mehrere der polaren Fraktionen (1-9) fähig waren die Expression des jeweiligen Reporterproteins deutlich zu stimulieren. Dies ist als Nachweis für das Vorkommen von polaren AhR Agonisten in diesen Fraktionen zu bewerten. Die insgesamt aktivsten Fraktionen zeigten Wirkstärken, die zwischen 60 und 90 % der durch 1  $\mu$ M BNF induzierten Effekte lagen und überstiegen damit auch das durch die nicht-fraktionierte Probe (S 4) induzierte Expressionsniveau von ca. 40 %.

Den Screening-Ergebnissen auf antagonistische Ligandenaktivität in Abbildung 36 ist zu entnehmen, dass insbesondere beim Luciferase-Assay, weniger stark beim EGFP-Assay, eine Inhibierung der durch 0,1  $\mu$ M BNF induzierten Reporterexpression durch verschiedene Fraktionen erfolgte. Daraus lässt sich schließen, dass es bei längeren Inkubationszeiten, wie beim EGFP-Assay mit einer Inkubationsdauer von 24 Stunden, durch zelluläre Metabolisierungsprozesse zur „Deaktivierung“ von metabolisch labilen AhR Antagonisten kommen kann, was sich in den weniger ausgeprägten Inhibierungseffekten im EGFP-Assay gegenüber dem Luciferase-Assay mit deutlich kürzerer Inkubationszeit äußerte (vgl. auch Abschnitt C 4.2).

Daneben war auch interessant, dass diese antagonistischen Wirkungen vorwiegend auf die polaren und mittelpolaren Fraktionen beschränkt waren, während bei den unpolaren keine oder nur eine schwache Beeinflussung der durch BNF induzierten Genexpression auftrat. Die antagonistische Wirkung von „Sojasauce 4“ ließ sich somit hauptsächlich Verbindungen mit polarem Charakter zuordnen, die durch das eingesetzte polare Lösungsmittelgemisch extrahierbar waren.

Insgesamt demonstrieren die Ergebnisse der beiden sensitiven Reporterbioassaysysteme das Vorkommen sowohl von AhR Agonisten als auch von AhR Antagonisten in verschiedenen Würz- und Sojasaucen, die als Modellsysteme für die komplexe

Zusammensetzung von Lebensmitteln ausgewählt wurden. Obwohl die Identität der AhR aktivierenden und inhibierenden Chemikalien in diesen Lebensmitteln noch weitgehend ungeklärt ist, zeigen unsere Ergebnisse und die anderer Arbeitsgruppen (Amakura et al., 2002; Jeuken et al., 2003), dass AhR Liganden in Lebensmittelprodukten weit verbreitet sind. Die Screeningergebnisse für die fraktionierte Sojasauce belegen außerdem, dass polare Inhaltsstoffe als AhR Agonisten wirken können, insbesondere aber auch eine starke antagonistische Aktivität aufweisen (Abb. 36 B).

Es ist anzunehmen, dass die in Würz- und Sojasaucen identifizierten Inhaltsstoffe wie z. B. Tryptophan und daraus abgeleitete  $\beta$ -Carbolinderivate, sowie weitere Inhaltsstoffe aus der Klasse der Flavonoide, wie z. B. die Sojaflavonoide Daidzein und Genistein, an den beobachteten Effekten beteiligt sind, deren AhR Ligandenpotential bereits als isolierte Verbindungen nachgewiesen wurde (vgl. Abschnitt C 3; Amakura et al. 2003). Zusätzlich ist vorstellbar, dass auch unbekannte Fermentations- und Erhitzungsprodukte aus dem Herstellungsprozess zur Gesamt-AhR-Aktivität in diesen komplexen Lebensmitteln beitragen.

## **5.4 Diskussion der Ergebnisse**

Die Mehrzahl der bisher identifizierten AhR Liganden sind synthetische Verbindungen. Es wurden aber auch zahlreiche natürlich vorkommende und endogene AhR Liganden identifiziert und charakterisiert (vgl. Abschnitt B 2). Die meisten Untersuchungen zur AhR Ligandenaktivität von Lebensmittelinhaltsstoffen fokussierten sich dabei auf die durch einzelne Verbindungen ausgelösten Effekte und erlaubten keine Beurteilung der Gesamtaktivität eines Lebensmittels oder seines Extrakts, das eine komplexe Mischung vielfältiger Substanzen darstellt (Amakura et al., 2003). Die Analyse von einzelnen aus Lebensmitteln isolierten Substanzen gab Aufschluss über deren Potential, den AhR Signalweg zu aktivieren oder zu inhibieren. Sie ermöglichte jedoch keine Aussage, ob diese Verbindungen auch tatsächlich ihre AhR-abhängige biologische Aktivität ausüben können, wenn sie in einem Extrakt oder dem Lebensmittel selbst vorkommen. Die Untersuchung und Aufklärung der Gesamt-AhR-Aktivität eines Rohextrakts oder eines

Lebensmittels erlaubte es dazu biologische und physiologisch relevante Informationen zu gewinnen.

Ziel unserer Studien zu den AhR Ligandenaktivitäten verschiedener Lebensmittelproben war es, das Vorkommen von AhR Agonisten und Antagonisten in komplexen Lebensmitteln zu beschreiben. Während bei den wenigen bisher publizierten Screenings von Gemüse, Früchten und Kräutern die Hexan-Extrakte dieser Produkte untersucht wurden (Bohonowych et al, 2000; Jeuken et al., 2003), konnten wir die wässrigen Soja- und Würzsaucen, nach Abzentrifugation von Trüb- und Schwebstoffen, direkt für die Inkubation mit den entsprechenden Zellsystemen einsetzen. Da in den veröffentlichten Studien mit dem Lösungsmittel Hexan nur die lipophilen Anteile der Proben extrahiert und der Untersuchung zugeführt wurden, und polare Anteile mit weiteren potentiellen AhR Liganden vernachlässigt wurden, könnte dies in einer erheblichen Unterbewertung der Gesamtaktivität der Probe resultieren. Unser Vorgehen ermöglichte es hingegen das gesamte Spektrum an AhR Liganden in den Proben zu beurteilen.

Unsere Experimente demonstrierten das Auftreten von zahlreichen unbekanntem polaren und unpolaren AhR Liganden in einer Reihe von Würz- und Sojasaucen. Diese Ergebnisse deckten sich mit den Untersuchungen von Denison und Mitarbeitern (2004a), die agonistische Aktivitäten nicht nur in DMSO-, sondern auch in polaren Ethanol- und Wasserextrakten verschiedener Papier- und Plastikprodukte nachweisen konnten (Denison et al., 2004a). Es erwies sich somit als vorteilhaft, wenn möglich, Lebensmittel als „Ganzes“ zu analysieren, um das vollständige Wirkpotential dieser komplexen Mischungen zu erfassen oder alternativ auch polare Extraktionsmittel einzusetzen, um polare AhR Liganden bei der Analyse nicht zu vernachlässigen.

Zusammenfassend konnten wir mit Hilfe der zellbasierten Reporteragen-Screeningassays zeigen, dass im lokalen Handel erhältliche Soja- und Würzsaucen als natürliche Quellen für AhR Liganden mit agonistischem und antagonistischem Potential einzuordnen sind. Die untersuchten Lebensmittelproben sind somit prinzipiell fähig über den AhR vermittelten Signalweg den Xenobiotika-Metabolismus zu modulieren, wenngleich die biologisch-toxikologische Relevanz *in vivo* noch zu untersuchen ist.

Berücksichtigt man die relativ geringen Mengen der untersuchten Proben von ca. 0,35 mg TM/Well, dann müssen diese Lebensmittelproben relativ hohe Konzentrationen an AhR Liganden bzw. relativ starke AhR Liganden enthalten. Das Vorkommen von vergleichsweise hohen Konzentrationen an AhR Liganden in Lebensmitteln wie Früchten, Gemüse und Kräutern (Bohonowych et al., 2000; Amakura et al., 2002; Jeuken et al., 2003) sowie in den von uns untersuchten fermentierten bzw. stark verarbeiteten Soja- und Würzsaucen stützt die These, dass sich der Ah Rezeptor als ein ligand-induzierbares System entwickelt hat, um den Metabolismus von endogenen und aus der Nahrung stammenden Verbindungen zu erleichtern.

Die Entwicklung bioassay-gestützter Fraktionierungsprozeduren zur Isolierung und Charakterisierung von bisher unbekanntem polaren und unpolaren AhR Liganden in Lebensmitteln und anderen relevanten Produkten könnte zusätzliche Einblicke in das breite Spektrum von Verbindungen liefern, die fähig sind an den Ah Rezeptor zu binden und die AhR Signaltransduktion zu aktivieren. Ein solches Vorgehen wird jedoch durch vielfältige Wechselwirkungen, wie antagonistische, additive und synergistische Effekte, die zwischen den Chemikalien in einer komplexen Mischung vorliegen können, erschwert. Auch das Auftreten unterschiedlicher, z. T. gegensätzlicher Wirkungen bei unterschiedlichen Konzentrationen, wie sie durch U-förmige Dosis-Wirkungskurven beschrieben werden, können diese Vorgehensweise erschweren (Marquardt und Schäfer, 2004).

Unsere Ergebnisse zeigten außerdem, dass die zellbasierten Reporterassays nicht nur zur Detektion und relativen Quantifizierung von Dioxinen und verwandten halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen in Umweltproben wie Serum, Flugasche und Boden geeignet sind, sondern auch den Nachweis von natürlichen AhR Liganden in Lebensmitteln ermöglichen. Die Reporterassays sind für diese Untersuchungen besonders geeignet, da sie den gesamten Ablauf des AhR vermittelten Signalwegs von Aufnahme in die Zelle, Bindung an den Rezeptor, Translokation in den Zellkern, Transformation in DNA-Bindungsform, Bindung an DRE und Transkription der nachgeschalteten Gene abdecken.

# **D Experimentaltteil**

## **1 Material**

### **1.1 Chemikalien**

Alle Chemikalien und Biochemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p.A.-Qualität von den Firmen Sigma, Fluka, Aldrich, Acros, Merck, Riedel-de Häen und Calbiochem bezogen. Die Herkunft weiterer spezieller Substanzen, insbesondere von Analysenkits, ist im Methodenteil vermerkt.

### **1.2 Untersuchungsmaterial**

Die verwendeten Lebensmittelproben wurden vom örtlichen Handel bezogen und bis zur Verwendung kühl gelagert.

### **1.3 Säulenchromatographie**

Als stationäre Phase wurde LiChroprep® RP-18 (Korngröße 40 - 63 µm; Merck) verwendet.

### **1.4 Membranfiltration**

Spartan 30/A Einmalfilter mit 0.2 µm Porengröße und 30 mm Durchmesser (Ziemer) wurden zur Filtration der Lebensmittelproben eingesetzt.

## 1.5 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien H1L6.1c2 und H1G1.1c3 sind durch stabile Transfektion der Plasmide pGudLuc6.1 (Luciferase-Zellen) bzw. pGreen1.1 (EGFP-Zellen) von der Mausleberzelllinie Hepa1c1c7 abgeleitete Klone (Rushing und Denison, 2002; Nagy et al., 2002; Han et al., 2004) (vgl. Abschnitt B 4.4.1). Sie wurden uns von Prof. Dr. M. S. Denison (Lehrstuhl für Environmental Toxicology der University of California, Davis, USA) zur Verfügung gestellt.

## 1.6 Zellkulturbedarf

Da für die Kultivierung permanenter Zelllinien sterile Arbeitsbedingungen erforderlich sind, wurden alle verwendeten Verbrauchsmaterialien, Geräte, Nährmedien und Arbeitslösungen vor Gebrauch mittels eines Autoklaven sterilisiert bzw. bereits als sterile Produkte bezogen.

### Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf
Einmalpipetten 10 ml und 25 ml	Falcon und Nunc
Zellkulturschalen Ø 100 mm	Corning
Multiwell-Zellkulturplatten (6 Löcher)	Falcon
Multiwell-Zellkulturplatten (12 Löcher)	Falcon
Zentrifugenröhren (PP) 50 ml und 15 ml	Falcon
96-Well-Platten (schwarz, klarer Boden)	Corning
96-Well-Platten (weiß, nicht steril, für Lumineszenzmessung )	Corning
96-Well-Platte (weiß, klarer Boden)	Corning
Sterilfilter 0,2 µm für Einmalspritzen	Schleicher&Schuell
Kryoröhrchen	Nalgene
Zellschaber	Corning
Pasteurpipetten	
Einmalspritzen	

### **Chemikalien für die Zellkultur**

Die verwendeten Zellkulturmedien, Antibiotika, Seren und sonstigen Arbeitslösungen wurden von LifeTechnologies (Gibco), Boehringer Mannheim und GemCell bezogen und entsprechend den Herstellerspezifikationen gelagert.

#### **Zellkulturmedien:**

- H1G1.1c3 Zellen (EGFP-Zellen): MEM- $\alpha$ -Medium mit L-Glutamin, Ribonukleotiden, Desoxyribonukleotiden, supplementiert mit 10 % FKS, 1 % Pen/Strep und 484 mg/l Geneticin (G418)
- H1L6.1c2 Zellen (Luciferase-Zellen): MEM- $\alpha$ -Medium mit L-Glutamin, Ribonukleotiden, Desoxyribonukleotiden, supplementiert mit 10 % FKS und 1 % Pen/Strep

#### **Arbeitslösungen für die Zellkultur:**

- Trypsin-EDTA (1x): 0,25 % Trypsin, 1 mM EDTA + 4 Na, ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$
- Penicillin-Streptomycin-Lsg.: 10 000 Einheiten Pen / ml und 10 000  $\mu\text{g}$  Strep / ml
- Geneticin (G418): 50 mg/ml als selektives Antibiotikum
- PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) pH 7,2
- FKS (Fötales Kälberserum): steril filtriert und hitzeinaktiviert

#### **Gefriermedium zur Kryokonservierung der Zellen:**

Eine Mischung aus 70 % Zellkulturmedium (mit 10 % FKS supplementiert), 20 % FKS und 10 % DMSO als Gefrierschutzmittel wird vor Verwendung frisch hergestellt und durch ein 0,2  $\mu\text{m}$  Einmalsterilfilter filtriert.

## **1.7 Material für die Gelretardation Assays (GRA)**

Acryl / Bis (30 / 0,8 %):	30 g Acrylamid und 0,8 g N,N'-Bis-Methylenacrylamid mit dest. H <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen und durch Whatman-Papier filtrieren
10 %ige APS-Lsg.:	10 mg Ammoniumpersulfat (APS) in 1 ml dest. H <sub>2</sub> O lösen
TEMED:	N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin

---

NSC:	poly(dI*C) als nicht spezifischer Kompetitor Die NSC-Konzentration sollte bei den cytosolischen Proben im Bereich 100 bis 400 ng/Inkubation und bei Zellkernextrakten bei 1 bis 4 µg/Inkubation liegen. Da poly(dI*C) oftmals unterschiedlich effektiv wirkt, muss die optimale Konzentration zur maximalen Ausbildung der Protein-DNA-Komplexe für jede Charge empirisch ermittelt werden.
0,5 M EDTA für TAE:	186,1 g Na <sub>2</sub> EDTA*2 H <sub>2</sub> O in 700 ml dest. H <sub>2</sub> O lösen, mit 10 M NaOH auf pH = 8,0 einstellen und auf 1 l auffüllen
3 M Natriumacetat-Lsg:	123 g Natriumacetat (anhydrous) in 240 ml dest. H <sub>2</sub> O lösen, mit Eisessig auf pH = 4,6 einstellen, auf 500 ml auffüllen
1 M Tris:	60,55 g Tris-Base in 400 ml dest. H <sub>2</sub> O lösen, pH-Wert auf 8,0 einstellen und auf 500 ml auffüllen
Laufpuffer TAE (10x):	67 ml 1 M Tris (pH = 8,0) 11 ml 3 M Natriumacetatlösung 20 ml 0,5 M EDTA (pH = 8,0) auf 1 l mit dest. H <sub>2</sub> O auffüllen
Ficoll GRA-Ladepuffer:	25 mg Bromphenolblau (0,25 %) 2,5 g Ficoll (Typ 400) 10 ml dest. H <sub>2</sub> O
Oligonukleotide:	5'-GATCTGGCTCTTCTCACGCAACTCCG-3' und 5'-GATCCGGAGTTGCGTGAGAAGAGCCA-3' (= Wild-Typ DRE)
Radioaktive Markierung der Oligonukleotide:	γ- <sup>32</sup> P-ATP (Amersham Biosciences); T4-Polynukleotidkinase-Kit (New England Biosciences)

## 1.8 Pufferherstellung

1 M DTT:	154 mg DTT / ml dest. H <sub>2</sub> O
HEDG-Puffer:	5,96 g Hepes in 800 ml dest. H <sub>2</sub> O lösen, pH-Wert mit 10 M NaOH auf 7,5 einstellen; 0,372 g Na <sub>2</sub> EDTA, 0,154 g DTT und 100 ml Glycerin zufügen und auf 1 l mit dest. H <sub>2</sub> O auffüllen.
10 mM Hepes (pH 7.5):	2,38 g Hepes/ l dest. H <sub>2</sub> O, pH auf 7,5 einstellen.
MDH-Puffer :	61 mg MgCl <sub>2</sub> und 0,596 g HEPES in 80 ml dest. H <sub>2</sub> O lösen und den pH-Wert mit 10 M NaOH auf 7,5 einstellen. Mit dest. H <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen und unmittelbar vor Gebrauch 154 mg DTT zugeben.
MDHK-Puffer:	610 mg MgCl <sub>2</sub> , 5,96 g HEPES und 7,456 g KCl in 800 ml dest. H <sub>2</sub> O lösen, den pH-Wert mit 10 M NaOH auf 7,5 bringen und mit dest. H <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen. Unmittelbar vor Gebrauch 154 mg DTT zugeben.
HEDGK4-Puffer:	5,96 g Hepes, 372 mg Na <sub>2</sub> EDTA, 100 ml Glycerin und 29,82 g KCl in 800 ml dest. H <sub>2</sub> O lösen, mit 10 M NaOH pH-Wert auf 7,5 einstellen und mit dest. H <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen. Unmittelbar vor Gebrauch 154 mg DTT zufügen.
HEDGK8-Puffer:	5,96 g Hepes, 372 mg Na <sub>2</sub> EDTA, 100 ml Glycerin und 59,65 g KCl in 800 ml dest. H <sub>2</sub> O lösen, mit 10 M NaOH pH-Wert auf 7,5 einstellen und mit dest. H <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen. Unmittelbar vor Gebrauch 154 mg DTT zufügen.
Rennealing-Puffer:	405 mg Tris*Cl, 132 mg MgCl <sub>2</sub> , 16 mg Spermidin und 242 mg EDTA in 45 ml dest. H <sub>2</sub> O lösen, pH mit 12 M HCl auf 7,5 einstellen. Unmittelbar vor Gebrauch 154 mg DTT zufügen.
T4 Kinase-Puffer:	660 µl 1 M Tris (pH 7,5), 10 µl 1 M Spermidin, 100 µl 1 M MgCl <sub>2</sub> , 150 µl 1 M DTT, 40 µl 500 mg/ml BSA und

100 ml dest. H<sub>2</sub>O mischen und zur Lagerung bei – 80 °C aliquotieren.

TE-Puffer: 1,21 g Tris\*Cl und 0,37 g Na<sub>2</sub>EDTA in 800 ml dest. H<sub>2</sub>O lösen und den pH-Wert mit 12 M HCl auf 8,0 bringen. Mit dest. H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen.

## 1.9 Proteinbestimmung

### **Proteinbestimmung mittels BioRad-Protein-Assay (für Zellkernextrakte):**

BSA-Stocklösung: 0,1 mg/ml in HDEK-Puffer

BioRad Farbstoff-Reagenz: 1:4 in Verdünnung des Konzentrats in H<sub>2</sub>O

### **Proteinbestimmung mittels Fluorescamin-Lösung (für Luciferase-Assay):**

BSA-Stocklösung: 5 mg/ml in Lysispuffer bei Verwendung von 6-Well-Zellkulturschalen

2,5 mg/ml in Lysispuffer bei Verwendung von 12-Well-Zellkulturschalen

Fluorescamin-Lösung: 500 µg Floram® / ml in Acetonitril

## 2 Geräte

### 2.1 Fluoreszenz-, Lumineszenz- und UV-Messgeräte

- Fluostar Galaxy (BMG) inkl. Fluoreszenz-, Lumineszenz- und Absorptions-Messkopf mit Fluostar-Software V4.20
- GENios (Tecan) mit Xfluor4 Software V4.2
- Microplate Luminometer Lucy2 (Anthos) mit Software LucySoft V1.5 und WinSelect V2.2 zur Proteinbestimmung
- V<sub>max</sub> Kinetic Microplate Reader (Molecular Devices) mit Software Softmax V2.02

### 2.2 Gelchromatographie

- Elektrophorese-Apparatur (vertikale Kammer)
- Power Supply System EC 105 (Fisher Biotech)
- Masterflex Pumpe FB105 (Cole-Parmer-Instruments)
- Geigerzähler Model 3 Survey Meter (Lablum Measurements)
- Szintillationszähler
- Geltrockner SGD 4050 (Thermo-Savant)

### 2.3 Gel-Auswertung

- PhosphoImager SI mit Software ScanControl V1.0, Image Quant Tools V1.0 und Image Quant Mac V1.2 (Molecular Dynamics)
- entsprechende PhosphoImager-Platten (20 x 25 cm)
- Fuji Medical X-Ray Film 100 NIF, 20,3 x 35,4 cm
- X-Ray Film Developer

## 2.4 Zentrifugen

- Microspin 24S und Microspin 12S (Sorvall)
- Vakuum-Micro-Ultrazentrifuge RC M100 mit Rotor RP 100 AT2 (Sorvall)
- Kühlzentrifuge Typ Universal 16R, Rotor 1616 & 1614 (Hettich)
- Biofuge (Heraeus)

## 2.5 Sonstige Geräte

pH-Meter:	Beckman $\Phi$ 32 pH-Meter (Beckman)
Waagen:	Mettler AJ 100, PE 600 und PL 300 (Mettler) Sartorius BP 210 S (Sartorius)
Rotavapor:	Büchi B-173, Vakuum-Controller B-720
Lyophilisator:	Christ Alpha 1-4; 0,1 mbar (Christ)
Sch�ttler:	Bellydancer (Storvall); Titer Plate Shaker (Lab-Line Instruments)

## 2.6 Flie sinjektionsanalyse mit MS-Detektion

Pumpe:	Hochdruckgradientenanlage (Applied Biosystems)
Injektor:	Rheodyne 8125 Probenventil, Probenschleife 5 $\mu$ l
Spektrometer:	Finnigan TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Tandemmassen-spektrometer (Finnigan MAT, Bremen) mit ESI-Interface
ESI-Kapillare:	desaktivierte Fused Silica Kapillare (50 $\mu$ m ID, J&W)
Sheath-Gas:	Stickstoff 5.0, 70 psi
Hilfsgas:	Stickstoff 5.0, 10 Skalenteile
Ionenquelle:	Atmosphärendruck, Raumtemperatur
Eingangskapillare:	200 $^{\circ}$ C
Kapillarspannung:	3 kV
Datenaufnahme u. Auswertung:	DEC 5000/33 Workstation (Digital Equipment, Unterföhring) und ICIS 8.1 Software (Finnigan MAT, Bremen)

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellkulturmethoden**

Alle durch Kontamination gefährdeten zellulären Arbeiten wurden unter Reinstluft-Bedingungen in einer Sterilwerkbank durchgeführt.

#### **3.1.1 Kultivierung und Passagieren der Zelllinien H1L6.1c2 (Luciferase-Zellen) und H1G1.1c3 (EGFP-Zellen)**

Die verwendeten Zelllinien H1L6.1c2 und H1G1.1c3 sind adhärent wachsende Kulturen. Die Kultivierung erfolgt als Monolayer in Zellkulturschalen ( $\varnothing$  100 mm). Das Passagieren der Kulturen erfolgt bei 70- bis 90%iger Konfluenz. Dazu wird das verbrauchte Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellschicht mit 5 ml sterilem PBS gewaschen und für wenige Minuten mit 1 ml Trypsin-EDTA inkubiert (Trypsinisieren). Anschließend wird durch Zugabe von 1 ml FKS-haltigem Zellkulturmedium das Trypsin neutralisiert. Durch vorsichtiges Spülen der Zellkulturplatte mit der Trypsin-Medium-Lösung werden noch anhaftende Zellen von der Zellkulturschale abgelöst und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren die Zellen vereinzelt. Die so erhaltene Zellsuspension wird zur Weiterführung der Zellkultur neu ausgesät. Dazu werden ca. 100  $\mu$ l der Zellsuspension in Zellkulturschalen mit 10 ml frischem Zellkulturmedium überführt und durch vorsichtiges Schütteln homogenisiert. Die Zellen haften innerhalb weniger Stunden an der Zellkulturschale an und beginnen zu proliferieren. Dieses Vorgehen entspricht einem Splittingverhältnis von 1:20.

Die H1L6.1c2 (Luciferase)- und H1G1.1c3 (EGFP)-Zellen unterscheiden sich bei der Kultivierung hinsichtlich Vorgehensweise und Handhabung nicht. Jedoch wird das Nährmedium für die EGFP-Zellen zusätzlich mit dem Selektionsantibiotikum Geneticin (G418) supplementiert.

Alle Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert und täglich mikroskopisch kontrolliert.

### 3.1.2 Auftauen und Kryokonservierung der Zellen

Alle verwendeten Zellen werden aus eingefrorenen Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und nach vorsichtigem Verdünnen in Zellkulturmedium ausplattiert. Nach ca. 12 bis 20 Stunden wird das Medium gewechselt.

Zur Herstellung eigener Stocklösungen werden subkonfluente Zellkulturplatten (ca. 50 %ige Konfluenz) herangezogen, die Zellen trypsinisiert, in eisgekühltem Zellkulturmedium aufgenommen und zentrifugiert. Das Zellpellet wird anschließend in Gefriermedium resuspendiert (ca.  $10^6$  Zellen/ml) und in 1,8 ml fassende Kryoröhrchen abgefüllt. Die Röhrchen werden in einen vorgekühlten und mit Isopropanol gefüllten Einfriercontainer (Nalgene) gestellt und über Nacht bei – 80 °C gelagert. Mit einer Abkühlrate von ca. 1 °C pro Minute gewährleistet dieser eine schonende Abkühlung der Zellen auf die Gefriertemperatur von – 80 °C, bevor sie am nächsten Tag zur Langzeitlagerung in eine Kühltruhe mit Flüssigstickstoff (- 196 °C) verbracht werden.

### 3.1.3 Ermittlung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mittels einer Neubauer-Zählkammer, die Vertiefungen eines definierten Volumens aufweist. Durch Beschicken der Zählkammer mit einer homogenen Zellsuspension lässt sich unter dem Mikroskop die Anzahl der Zellen in einem bekannten Volumen auszählen.

Die Zellzahl (Zellen/ml) berechnet sich nach der Formel:

$$\text{Zellzahl (Zellen/ml)} = (\text{Mittelwert der gezählten Zellen pro Quadrat}) \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$$

## 3.2 Reportergenassays

**Vorbemerkung:** Das oben aufgeführte Zellkulturmedium MEM- $\alpha$ -Medium supplementiert mit 10 % FKS und 1 % Pen/Strep, ohne Zusatz des Selektionsantibiotikums Geneticin ist Grundlage für die Reportergenassays beider Zelllinien.

### 3.2.1 EGFP-Reportergenassay

**Ausplattieren der Zellen:** Die in MEM- $\alpha$ -Medium mit 10 % FKS, 1 % Pen/Strep und 484 mg/l G418 kultivierten H1G1.1c3-Zellen (EGFP-Zellen) werden bei ca. 90 %iger Konfluenz trypsiniert und zur Durchführung des EGFP-Assays herangezogen. Dazu wird die Zellzahl pro Platte bestimmt (ca. 8 Millionen. Zellen/Platte) und die Zelldichte mit nicht-selektivem MEM-Medium auf ca. 750 000 Zellen/ml eingestellt. Mittels einer Mehrkanalpipette werden je 100  $\mu$ l dieser Zellsuspension in jede Vertiefung einer schwarzen, 96-Well-Zellkulturplatte mit durchsichtigem Boden gegeben. Zum Anhaften der Zellen werden die Platten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert.

**Behandlung der Zellen:** Pro Behandlung werden 396  $\mu$ l nicht-selektives Medium mit 4  $\mu$ l der zu testenden, in DMSO bzw. in H<sub>2</sub>O gelösten Chemikalien in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt. Mittels einer Pasteurpipette mit aufgesteckter Pipettenspitze wird das Medium aus allen Wells abgesaugt, ohne dabei den Zellmonolayer zu verletzen. Pro Well werden 100  $\mu$ l des so behandelten Mediums aufgetragen, wobei alle Proben (Testsubstanzen, Positivkontrolle und Negativkontrolle) als Triplikate eingesetzt werden. Daneben werden drei Ansätze mit unbehandeltem Medium mitgeführt. Die Inkubation der Platten erfolgt anschließend für 24 Stunden bei 33 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

**Messung:** Das in den Zellen exprimierte Reportergen EGFP wird mittels eines Mikroplatten-Fluorometers vermessen. Die Anregung bei 484 nm und die Messung der Emission bei 515 nm bzw. 510 nm (je nach Filterausstattung des Geräts) (Bandbreite 10 nm) erfolgen dabei von unten durch den durchsichtigen Boden der 96-Well-Zellkulturschale, ohne Entfernung des Mediums.

**Auswertung:** Da das Zellkulturmedium zu der im Assay auftretenden Hintergrundfluoreszenz beiträgt, wird zur Auswertung die Fluoreszenzaktivität der Wells, die nur Medium enthalten (unbehandelte Zellen), von der Fluoreszenzaktivität aller anderen Proben subtrahiert. Die so erhaltenen Fluoreszenzmesswerte (RFU) werden als prozentualer Anteil der Induktion durch TCDD bzw. BNF ausgedrückt (z. B. %-Induktion bezogen auf 100 nM BNF).

### 3.2.2 Luciferase-Reportergenassay

Zur Analyse der Luciferaseaktivität der behandelten H1L6.1c2-Zellen (Luciferase-Zellen) wird der Luciferase-Assay-Kit von Promega verwendet, der sowohl das Luciferase-Assay-Substrat als auch das Zellkultur-Lysis-Reagenz (Lysispuffer) enthält.

**Ausplattieren der Zellen:** Die in MEM- $\alpha$ -Medium mit 10 % FKS und 1 % Pen/Strep kultivierten H1L6.1c2-Zellen (Luciferase-Zellen) werden bei ca. 90 %iger Konfluenz trypsiniert und zur Durchführung des Luciferase-Assays herangezogen. Die Zellen werden in Multiwell-Zellkulturplatten mit sechs bzw. zwölf Wells ausgesät und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> unter humiden Bedingungen bis zur Ausbildung eines konfluenten Monolayers inkubiert.

**Behandlung der Zellen:** Zur Behandlung der Zellen mit den zu testenden Verbindungen, der Positivkontrolle TCDD bzw. BNF und der Negativkontrolle DMSO werden jeweils drei Wells mit dem entsprechend vorbereiteten nicht-selektiven Medium versetzt und für 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter humiden Bedingungen inkubiert.

**Aufarbeitung der Zellen:** Zur Vorbereitung der Messung muss die in den Zellen exprimierte Luciferase durch Zelllyse freigesetzt werden. Dazu wird zunächst das Medium abgesaugt, ohne den Zelllayer zu beschädigen, und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend werden pro Well 100  $\mu$ l Lysispuffer zugesetzt und für 30 Minuten bei RT geschüttelt. Es wird mikroskopisch kontrolliert, dass sich die Zellen ablösen und lysieren. Mit Hilfe eines Zellschabers werden restliche Zellfragmente von der Zellkulturschale abgelöst und das Lysat in auf Eis gelagerte Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die so erhaltenen Zelllysate werden bis zur Lumineszenzmessung und Proteinbestimmung bei – 80 °C gelagert.

**Messung:** Zur Messung werden die eingefrorenen Zelllysate aufgetaut und in einer Kühlzentrifuge bei 12 000 rpm für 1 min zentrifugiert. Anschließend werden pro Probe 50  $\mu$ l Lysat in eine weiße 96-Well-Platte mit solidem Boden pipettiert, wobei die Wells der Reihe H für die Proteinbestimmung frei bleiben müssen. Die Messung der

Luciferaseaktivität in den Proben erfolgte in einem Mikroplatten-Luminometer bei RT. Für jedes Well wurde nach automatischer Zudosierung von 50 µl Luciferin und einer Lag-Phase von 10 Sekunden das freigesetzte Licht über ein Intervall von 10 Sekunden gemessen.

Im Anschluss wird die Proteinkonzentration der einzelnen Proben mittels des Fluorescamin-Assays bestimmt und die Luciferaseaktivität auf den Proteingehalt der Proben normiert.

**Auswertung:** Die für alle Proben erhaltenen relativen Lumineszenzeinheiten bezogen auf den Proteingehalt (RLU/µg Protein) werden als prozentualer Anteil der Induktion durch TCDD bzw. BNF ausgedrückt (z. B. %-Luciferase-Induktion bezogen auf 100 nM BNF).

**Alternative Durchführung:** Alternativ kann dieser Assay auch in einer 96-Well-Zellkulturplatte durchgeführt werden. Dazu werden die H1L6.1c2-Zellen (Luciferase-Zellen) in einer weißen 96-Well-Platte mit durchsichtigem Boden ausgesät, mit den entsprechenden Testsubstanzen behandelt und mit 50 µl Lysispuffer pro Well lysiert. Die anschließende Messung der Luciferase-Aktivität und die Bestimmung des Proteingehalts im Lysat erfolgt wie oben dargestellt.

### 3.3 Methoden zum Gelretardation Assay (GRA)

Die hier beschriebenen Methoden zur Analyse des AhR Signaltransduktionswegs mittels Gelretardationstechniken sind aus „Current Protocols in Toxicology Online“ entnommen und wurden, wenn notwendig, entsprechend den vorhandenen technischen Gegebenheiten angepasst.

#### 3.3.1 Durchführung des Gelretardation Assays (GRA)

**Herstellung des 4%igen GRA-Gels:** Mit 95%igem Ethanol gereinigte Glasplatten wurden mit den zugehörigen Abstandshaltern zusammengesetzt und mit Klammern fixiert. Für ein Gel werden 4,5 ml TAE-Puffer (10x), 34 ml dest. H<sub>2</sub>O, 6 ml der Acryl/Bis-Mischung und 0,45 ml einer frisch hergestellten 10%igen Ammonium-

persulfat-Lösung gemischt. Nach Zugabe von 22,5 µl TEMED wird das Gel zügig gegossen und ein Kamm zur Erzeugung der Geltaschen luftblasenfrei eingesetzt. Nach Beendigung der Polymerisation (ca. 20 Minuten) wird der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in die Gelchromatographie-Apparatur eingespannt.

**Durchführung der Chromatographie:** Die Pufferreservoirs der Gelchromatographie-Apparatur werden mit 1x Laufpuffer (1x TAE-Puffer) gefüllt und die peristaltischen Pumpen eingeschaltet. Zur Beseitigung von Luftblasen werden die Geltaschen und Plattenzwischenräume mittels einer Spritze mit Laufpuffer ausgespült. Vor dem Auftragen der Proben in die Geltaschen sollte das Gel ca. 120 Minuten einer Pre-Elektrophorese bei 130 V unterworfen werden. Zum Auftragen der Proben aus der Inkubation von Cytosol bzw. der Zellkernextrakte werden jeweils 20 µl der Probe in eine Geltasche pipettiert. Bis die Proben vollständig in das Gel eingedrungen sind, wird die Apparatur bei 60 V betrieben. Dann wird die Auftrennung der Proben bei 130 V durchgeführt bis der Farbstoff ca. 3 cm vor dem unteren Rand des Gels angekommen ist (Dauer ca. 2 bis 2,5 Stunden).

Anschließend wird das Gel herausgenommen, auf Blotting-Papier übertragen, um Kontaminationen zu vermeiden in Klarsichtfolie eingeschlagen, und in einem Gel-trockner für 1 bis 2 Stunden getrocknet.

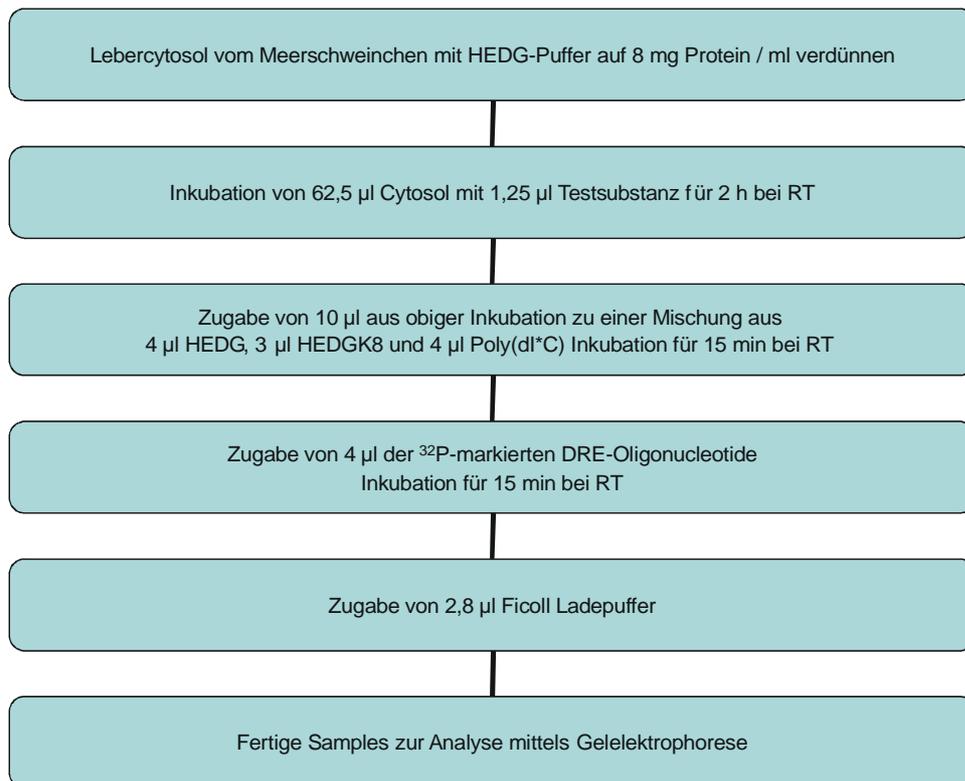
**Entwicklung des Gels:** Zur Identifizierung der Proteinbanden wird das Gel mittels Autoradiographie entwickelt. Dazu wird das trockene Gel mit einem Röntgenfilm und „intensifying screens“ in einer Kassette über Nacht bei -80 °C inkubiert. In einer Dunkelkammer werden die Röntgenfilme entnommen und entwickelt. Zusätzlich werden die Gele mit Phosphoimager-Platten bei RT für 24 Stunden inkubiert und die Banden mittels eines Phosphoimagers (semi-)quantifiziert.

### 3.3.2 Gelretardation Assay mit Cytosol

**Inkubation mit Cytosol :** Zur Inkubation wird das Meerschweinchen-Lebercytosol mit HEDG-Puffer auf die Proteinkonzentration 8 mg/ml verdünnt. Für jede Probe werden 62,5 µl Cytosol in ein 500 µl Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit 1,25 µl (bzw. 0,625 µl) des zu testenden Liganden in entsprechender Konzentration versetzt (das

Verhältnis Ligand zu Cytosol sollte 1:50 betragen). Analog werden 1,25 µl DMSO als Kontrollprobe bzw. 1,25 µl 1 µM TCDD als Positivkontrolle eingesetzt. Alle Proben werden bei RT für 2 Stunden inkubiert.

**DNA-Bindungsreaktion:** Für jede Probe wird jeweils ein weiteres 500 µl Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 4 µl HEDG, 3 µl HEDGK8 und 4 µl poly(dI\*C) in HEDG-Puffer (250 ng/4 µl HEDG) vorbereitet. Zu dieser Mischung werden 10 µl der Inkubationslösung gegeben und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend werden 4 µl der <sup>32</sup>P-markierten DRE-Oligonukleotide (ca. 100 000 cpm) in jedes Reaktionsgefäß gegeben und für weitere 15 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 2,8 µl des Ficoll-GRA-Ladepuffers werden die Proben auf das Gel aufgetragen.



**Abb. 37:** Übersichtsschema zur Inkubation von Cytosol mit möglichen AhR Liganden

### 3.3.3 Gelretardation Assay mit Zellkernextrakten

Mit den gemäß Präparationsvorschrift (siehe Abschnitt D 3.4) erhaltenen Zellkernextrakten wird für die Gelretardation Analyse analog verfahren. Jedoch enthalten die Zellkernextrakte im Unterschied zum Cytosol bereits die DNA-Bindungsform der zu untersuchenden Proteine, sodass die zweistündige Inkubation mit dem Liganden nicht notwendig ist. Daneben wird zur DNA-Bindungsreaktion kein HEDGK-Puffer zugesetzt, da die Extrakte bereits 0,4 M KCl enthalten. Zur Inkubationslösung werden maximal 5 µl Zellkernproteine gegeben, sodass die Salzkonzentration im Inkubationsansatz 80 mM KCl entspricht. Da alle im Zellkernextrakt vorhandenen Proteine DNA-bindende Proteine sind, wird die Menge an in HEDG gelöstem poly (dI\*C) für den Bindungsassay auf 1,5 µg/4 µl erhöht.

Zunächst wird die Proteinkonzentration in den Zellkernextrakten mit HEDGK4-Puffer auf 1,5 bis 2 µg/µl eingestellt, wobei alle Proben und Kontrollansätze gleiche Protein- und Salzkonzentrationen aufweisen müssen (die endgültige KCl-Konzentration in jedem Ansatz sollte zwischen 80 – 160 mM betragen).

Anschließend werden in 500 µl Reaktionsgefäßen jeweils 5 µl Zellkernextrakt mit 7 µl HEDG-Puffer, 5 µl HEDG4-Puffer und 4 µl poly(dI\*C)-Lösung (in HEDG) gemischt und die Mischungen für 15 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl der <sup>32</sup>P-markierten Oligonukleotide wird erneut für 15 Minuten bei RT inkubiert. Durch Hinzupipettieren von 3 µl des Ficoll-Ladepuffers sind die Proben fertig zum Auftragen auf das Gel.

### 3.3.4 Herstellung von <sup>32</sup>P-markieren Doppelstrang-Oligonukleotiden für die Gelretardation Assays

**Vorgehensweise:** Die Einzelstrang-Oligonukleotide werden zusammengelagert und an ihrem 5'-Ende mittels einer T4 Polynukleotidkinase und  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP phosphoryliert. Nach Entfernung des freien  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP wird die Probe auf die für die GRAs gewünschte Konzentration verdünnt.

**(Re-)Annealing der DNA-Sonde:** Zunächst wird die DNA-Konzentration der aufgereinigten Einzelstrang-DRE-Nukleotide durch Messung der Absorption eines Aliquots bei 260 nm bestimmt. Dabei gilt: 1 Abs<sub>260 nm</sub>-Einheit entspricht 34 µg DNA/ml für Einzelstrang-Oligonukleotide.

Da der Ah Rezeptor (wie die meisten Transkriptionsfaktoren) nur an doppelsträngige DNA bindet, synthetisch aber nur Einzelstrang-DNA hergestellt werden kann, ist zunächst eine Anlagerung (Annealing) der beiden komplementären DNA-Stränge erforderlich, um eine intakte Bindungsstelle zu erhalten.

Dazu werden je 225 µg der komplementären Oligonukleotide in ein 1 ml Mikrozentrifugenröhrchen gegeben, bis zur Trockne eingengt, in 75 µl des Reannealing-Puffers aufgenommen und 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Anschließend wird langsam auf RT abgekühlt, um eine erneute Dissoziation zu vermeiden. Die DNA-Konzentration der zusammengelagerten DRE-Oligonukleotide kann durch erneute Messung der Absorption bei 260 nm nach der Formel: 1 Abs<sub>260 nm</sub>-Einheit entspricht 50 µg DNA/ml für Doppelstrang-Oligonukleotide berechnet werden.

**Radioaktive Markierung der DNA-Sonde:** Zur radioaktiven Markierung der doppelsträngigen (ds) Oligonukleotide wird ein T4-Polynukleotidkinase-Kit von New England Biosciences eingesetzt.

In ein 0,5 ml Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss werden 25 µl dest. H<sub>2</sub>O, 10 µl der ds Oligonukleotide (Konzentration 20 – 25 ng/µl), 5 µl T4 Kinase-Puffer, 8 µl  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP-Lösung (5000 - 8000 Ci/mmol) und 2 µl der T4 DNA Polynukleotidkinase (10 U/µl) gegeben und die Mischung für 30 Minuten bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Anschließend werden zur Reaktionsmischung 50 µl TE-Puffer gegeben, die Mischung zur Aufreinigung auf eine Sephadex G-50 Spin-Säule (SpinPure™ G-50 von CPG) aufgetragen und für 2 Minuten bei 1000 g bei RT zentrifugiert. Die so erhaltene Lösung an radioaktiv markierter DNA wird 1:10 in HEDG-Puffer verdünnt und ein Aliquot von 4 µl zur Szintillationszählung herangezogen. Dieser sollte ca. 10<sup>6</sup> cpm/µl aufweisen. Zur Verwendung im GRA muss diese radioaktive Stock-Lösung mit HEDG-Puffer auf 100 000 cpm/4 µl verdünnt werden.

### 3.4 Präparieren von Zellkernextrakten aus kultivierten Zellen

**Prinzip:** Die Isolierung der Zellkernproteine erfolgt aus kultivierten Hepa-Zellen, die mit TCDD als Positivkontrolle, mit DMSO als Negativkontrolle bzw. mit den zu testenden Verbindungen inkubiert werden. Nach der Behandlung der Zellen mit den Chemikalien, werden die Zellen geerntet, gewaschen und in hypotonischen Puffer inkubiert. Die angeschwollenen Zellen werden durch Abkratzen geerntet, homogenisiert und die Zellkerne abzentrifugiert. Die Niederschläge der Rohzellproteinextrakte werden gewaschen und in einem stark salzhaltigen Puffer resuspendiert, was zur Freisetzung der löslichen Zellkernproteine führt. Mittels anschließender Zentrifugation werden die Zellkerne abzentrifugiert und der stark salzhaltige Kernextrakt (Überstand) wird zur Analyse herangezogen.

**Behandlung der Zellen:** Typischerweise werden je sechs 10 cm große, konfluent bewachsene Zellkulturschalen zur Gewinnung der Zellkernextrakte für jede Testsubstanz eingesetzt. Pro Platte werden 2 ml Zellkulturmedium, das mit der zu testenden Verbindung versetzt wurde, aufgetragen und anschließend für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Für die Positivkontrolle werden 1 µl einer 1 µM TCDD in DMSO-Lösung pro ml Zellkulturmedium und für die Negativkontrolle 1 µl DMSO pro ml Zellkulturmedium (0,1 % (v/v) DMSO) zugegeben.

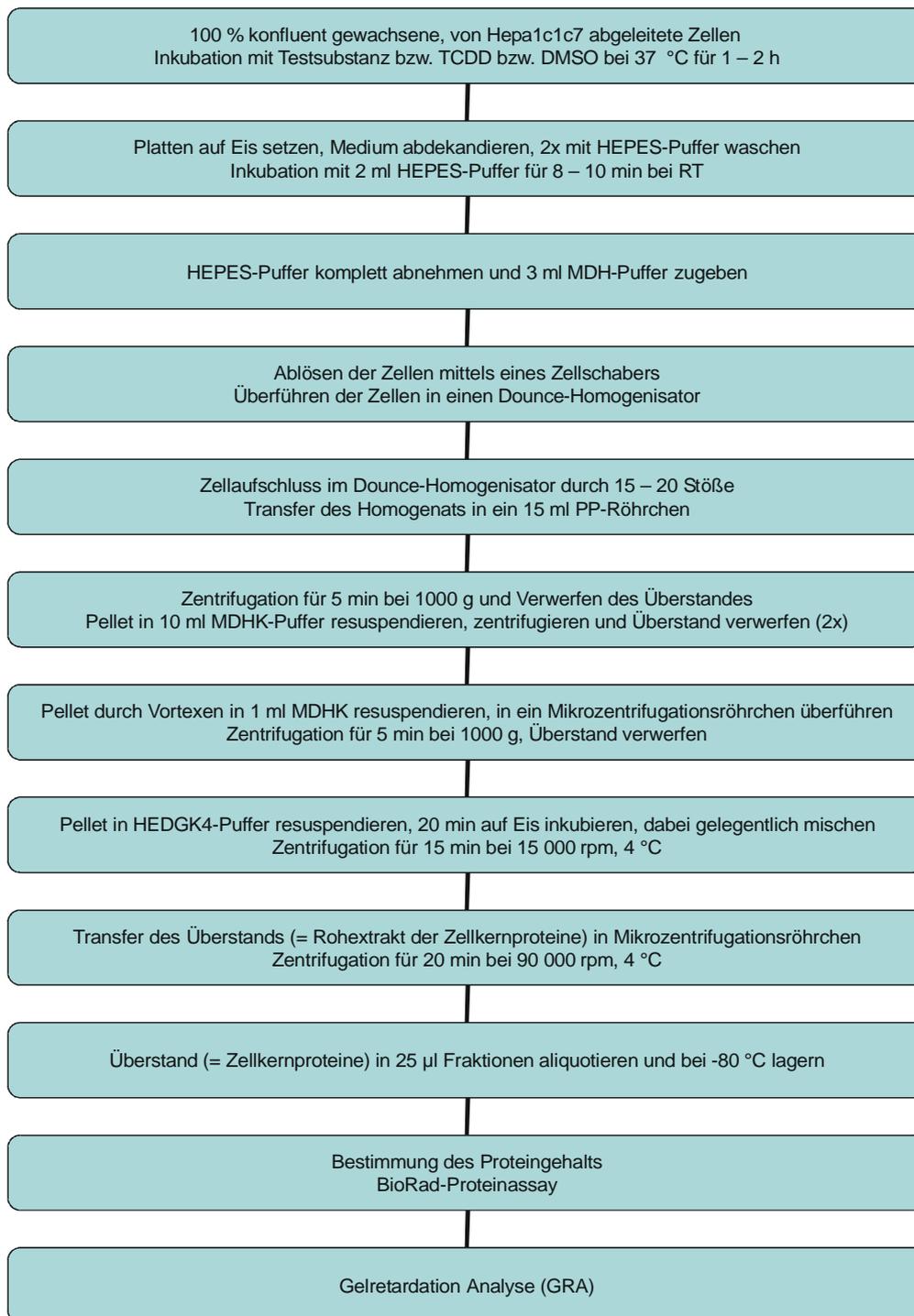
**Gewinnung der Zellextrakte:** Nach der Inkubation werden die Platten auf Eis gesetzt, das Medium abdekantiert und die Zellen zweimal mit 5 ml 10 mM HEPES-Puffer gewaschen. Anschließend werden 2 ml HEPES-Puffer auf jede Platte aufgetragen und diese für 10 Minuten bei RT stehen gelassen.

Anschließend wird der HEPES-Puffer abpipettiert, jede Platte mit 1 ml MDH-Puffer versetzt und die Zellen durch Abkratzen mit einem Schaber geerntet. Die Zellen werden in einen eisgekühlten 6-ml-Dounce Homogenisator übergeführt, durch 15 bis 20 Stöße mit dem B-Pistill homogenisiert und das Homogenat in ein auf Eis gelagertes 15 ml Zentrifugenröhrchen transferiert.

Das Homogenat wird für 5 Minuten bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert, sodass die Nuclei sedimentieren und ein weißliches, lockeres Kernpellet entsteht. Der Überstand wird mit einer Pasteurpipette abgenommen, pro ursprünglich eingesetzter Zellkulturplatte werden 2 ml MDHK-Puffer zugesetzt, das Pellet durch vorsichtiges Vortexen resuspendiert und erneut 5 Minuten bei 1000 g bei 4 °C zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wird einmal wiederholt.

Anschließend wird 1 ml MDHK-Puffer zugegeben und das Nuclei-Pellet durch sanftes Vortexen erneut resuspendiert. Die Mischung wird in ein 1,5 ml Mikrozentrifugationsröhrchen übergeführt, 5 Minuten bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die rohen Nuclei-Pellets werden in HEDGK4-Puffer (25 µl pro eingesetzte Platte) durch leichtes Anklopfen der Röhrchen resuspendiert. Anschließend wird für 20 Minuten auf Eis inkubiert, wobei alle 5 Minuten durch leichtes Schütteln gemischt wird. Abschließend werden die Extrakte bei 4 °C und 15 000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, indem sich nun die Zellkernproteine befinden, wird in ein 0,5 ml Mikro-Ultrazentrifugenröhrchen aus Polypropylen überführt und in einer Sorvall RCM 100 Mikro-Ultrazentrifuge (Rotor RP100AT) für 20 Minuten bei 90 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die so erhaltenen Zellkernextrakte werden zweckmäßigerweise in Aliquoten von 25 µl bei – 80 °C eingefroren. Die Proteinkonzentrationen der Zellkernextrakte werden mit den Bio-Rad Proteinassay bestimmt. Die erwünschte Proteinkonzentration sollte mindestens 2 µg/µl betragen (vgl. Abb. 38).



**Abb. 38:** Aufarbeitungsschema zur Gewinnung der Zellkernextrakte

## **3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration**

### **3.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Proteinbestimmung der Zellkernextrakte erfolgt nach der Mikrotitermethode des BioRad-Protein-Assays, der auf der Methode von Bradford basiert. Dazu wird jeweils ein Aliquot der Zellkernextrakte (Abschnitt D 3.4) entsprechend den Herstellerangaben mit dem verdünnten Farbstoff-Reagenz gemischt und nach 10 Minuten die Absorption der Reaktionslösung bei 595 nm in einen Spektralphotometer für Mikrotiterplatten bestimmt. Parallel werden BSA-Proteinstandards in den Konzentrationen 0 bis 5 µg Protein/Well als Triplikate mitgeführt und die Proteinkonzentration der Proben daraus ermittelt.

### **3.5.2 Proteinbestimmung mittels Fluorescamin-Assay**

Nach beendiger Messung der Luciferaseaktivität in den Zelllysaten wird der Proteingehalt der einzelnen Proben mit Hilfe des Fluorescamin-Assays ermittelt. Zur Korrelation der Proteinkonzentrationen in den Proben werden in die Wells der freigebliebenen Reihe H verdünnte Lösungen des Proteinstandards BSA (Bovine Serum Albumin) in Triplikaten gegeben. Zu den Proteinstandards werden noch 50 µl der Luciferase-Lösung hinzugefügt, damit alle Wells gleiche Bedingungen und das gleiche Gesamtvolumen aufweisen. Anschließend werden zu jeder Probe und zu den Proteinstandards 100 µl der Fluorescamin-Lösung pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird mit Alufolie lichtundurchlässig verschlossen und für 20 Minuten bei RT geschüttelt. Die Quantifizierung der Intensität des entstehenden Farbstoffs erfolgt durch Excitation bei 390 nm und Messung der Emission bei 460 nm.

## **3.6 Fraktionierung der Sojasoße**

Zum Abtrennen von Trüb- und Schwebstoffen werden 100 ml der zu fraktionierenden Sojasauce für ca. 30 min bei 9000 rpm zentrifugiert und anschließend lyophilisiert. Zur Fraktionierung über präparative RP18-Säulenchromatographie werden 3 g der lyophil-

isierten Sojasauce (= eingesetzte Trockenmasse, TM) in ca. 5 ml H<sub>2</sub>O/0,05 % TFA gelöst und auf die RP18-Säule aufgetragen. Pro 1 g Probe werden ca. 30 g RP18-Material zur Trennung eingesetzt. Die Elution erfolgt diskontinuierlich mit einem Acetonitril-H<sub>2</sub>O/0,05 % TFA-Gemisch sinkender Polarität (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 100 % MeCN, jeweils 200 ml). Es werden Fraktionen von etwa 14 ml gesammelt und diese massenspektrometrisch untersucht. Dazu werden Aliquote der isolierten Fraktionen ohne chromatographische Trennung direkt mittels Fließinjektion (5 µl) im positiven „full-scan“-Modus gescannt (Geräteparameter siehe Abschnitt D 2.6). Als Fließmittel dient ein Acetonitril-H<sub>2</sub>O/ 0,05 % TFA-Gemisch (1:1) mit einem Fluss von 200 µl/min. Gleiche Fraktionen werden vereinigt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und anschließend lyophilisiert. Die einzelnen isolierten Fraktionen werden ausgewogen und definiert in H<sub>2</sub>O/0,05 % TFA gelöst.

Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Fraktionierung einer Sojasauce wurde in den Fraktionen insgesamt 85,7 %, der eingesetzten Trocken-masse wiedergefunden.

Aus Gründen der Vergleichbarkeit der Ergebnisse für die nicht-fraktionierte Sojasauce und für die Fraktionen dieser Sojasauce in den Reporterassays wurde angestrebt, für alle Proben eine einheitliche Konzentration an Sojasaucen-Trockenmasse pro Well einzusetzen. Bei der durchgeführten Fraktionierung ergab sich, abhängig von der erhaltenen Menge an Trockenmasse und der Löslichkeit jeder Fraktion, eine durchschnittliche Konzentration von  $0,35 \text{ mg} \pm 0,09 \text{ mg TM/well}$ .

Daneben ist darauf hinzuweisen, dass aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Mengen der einzelnen Fraktionen die alternative Durchführung des Luciferase-Assays in 96-Well-Platten gewählt wurde, da hier kleinere Mengen an Testsubstanz zur Behandlung der Zellen notwendig sind.

### **3.7 Auswertung**

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit Microsoft Excel, GraphPad Prism 4 und SigmaPlot 2001. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde der Student t-Test und die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) herangezogen. Diese erfolgte mittels der Software Microsoft Excel und Analyse-It V1.71.

## E Literaturverzeichnis

Abbott, B.D., Buckalew, A.R., DeVito, M.J., Ross, D., Bryant, P.L., Schmid, J.E. (2003) EGF and TGF- $\alpha$  expression influence the developmental toxicity of TCDD: dose response and AhR phenotype in EGF, TGF- $\alpha$ , and EGF + TGF- $\alpha$  knockout mice. *Toxicol. Sci.* **71**, 84–95

Abnet, C.C., Tanguay, R.L., Heideman, W., Peterson, R.E. (1999) Transactivation activity of human, zebrafish, and rainbow trout aryl hydrocarbon receptors expressed in COS-7 cells: greater insight into species differences in toxic potency of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran and biphenyl congeners. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **159**, 41-51

Adachi, J., Asano, M., Ueno, Y. (2000) Tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acids and contaminants of L-tryptophan. *J. Chromatogr. A*, **881**, 501-515

Adachi, J., Mori, Y., Matsui, S., Takigami, H., Fujino, J., Kitagawa, H., Miller, C.A. III., Kato, T., Saeki, K., Matsuda, T. (2001) Indirubin and Indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J. Biol. Chem.* **276**, 31475–31478

Alam, J., Cook, J.L. (1990) Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal. Biochem.* **188**, 245-254

Allen, S.W., Mueller, L., Williams, S.N., Quattrochi, L.C., Raucy, J. (2001) The use of a high-volume screening procedure to assess the effects of dietary flavonoids on human CYP1A1 expression. *Drug Metabolism and Disposition DMS*, **29**, 1074-1079

Amakura Y., Tsutsumi, T., Nakamura, M., Kitagawa, H., Fujino, J., Sasaki, K., Yoshida, T., Toyoda, M. (2002) Preliminary screening of the inhibitory effect of food extracts on activation of the aryl hydrocarbon receptor induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 272-274

Amakura Y., Tsutsumi, T., Nakamura, M., Kitagawa, H., Fujino, J., Sasaki, K., Toyoda, M., Yoshida, T., Maitani, T. (2003) Activation of the aryl hydrocarbon receptor by some vegetable constituents determined using *in vitro* reporter gene assay. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 532-539

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

Andreola, F., Fernandez-Salguero, P.M., Chiantore, M.V., Petkovich, M.P., Gonzalez, F.J., De Luca, L.M. (1997) Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR-/-) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism. *Cancer Res.* **57**, 2835–2838

- Antonsson, C., Whitelaw, M. L., McGuire, J., Gustafsson, J. A., Poellinger, L. (1995) Distinct roles of the molecular chaperone hsp90 in modulating dioxin receptor function via the basic helix-loop-helix and PAS domains. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 756-765
- Ashida, H. (2000) Suppressive effects of flavonoids on dioxin toxicity. *BioFactors*, **12**, 201-206
- Ashida, H., Fukuda, I., Yamashita, T., Kanazawa, K. (2000) Flavones and flavonols at dietary levels inhibit a transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin. *FEBS Letters*, **476**, 213-217
- Astorg, P., Gradelet, S., Leclerc, J., Canivenc, M.C., Siess, M.H. (1994) Effects of  $\beta$ -carotene and canthaxanthin on liver xenobiotic-metabolizing enzymes in the rat. *Food Chem. Toxicol.* **32**, 735-742
- Atkinson, R. (1991) Atmospheric lifetimes of dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. *Sci. Total Environ.* **104**, 17-33
- Baba, T., Mimura, J., Gradin, K., Kuroiwa, A., Watanabe, T., Matsuda, Y., Inazawa, J., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y. (2001) Structure and expression of the Ah Receptor Repressor Gene. *J. Biol. Chem.* **276**, 33101-33110
- Bailey, P.D., Hollinshead, S.P., McLay, N.R., Morgan, K., Palmer, S.J., Prince, S.N., Reynolds, C.D., Wood, S.D. (1993) Diastereo- and enantio-selectivity in the Pictet-Spengler reaction. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 431-439
- Ballschmiter, K., Bacher, R. (1996) Dioxine - Chemie, Analytik, Vorkommen, Umwelt-verhalten und Toxikologie der halogenierten Dibenzo-*p*-dioxine und Dibenzofurane. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Bank, P.A., Yao, E.F., Swanson, H.I., Tullis, K., Denison, M.S. (1995) DNA binding of the transformed guinea pig hepatic Ah receptor complex: Identification and partial characterization of two high-affinity DNA-binding forms. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**, 439-448
- Barker, S.A., Harrison, R.E.W., Monti, J.A., Brown, G.B., Christian, S.T. (1981) Identification and quantitation of 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline and 6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline as in vivo constituents of rat brain and adrenal gland. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 9-17
- Baum, S.S., Hill, R., Rommelspacher, H. (1996) Harman-induced changes of extracellular concentrations of neurotransmitters in the nucleus accumbens of rats. *Eur. J. Pharmacol.* **314**, 75-82
- Beck, O., Bosin, T.R., Lundman, A. (1983) Analysis of 6-hydroxy-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline in alcoholic beverages and food. *J. Agric. Food Chem.* **31**, 288-292
- Beebe, L.E., Fornwald, L.W., Diwan, B.A., Anver, M.R., Anderson, L.M. (1995) Promotion of N-nitrosodiethylamine-initiated hepatocellular tumors and hepatoblastomas by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin or Aroclor 1254 in C57BL/6, DBA/2, and B6D2F1 mice. *Cancer Res.* **55**, 4875-4880

- Behnisch, P., Hosoe, K., Shiozaki, K., Sakai, S. (2000) Determination of the dioxinlike activity of several polyhalogenated (X = Br, Cl) aromatic hydrocarbons (PHAHs) by the micro-EROD bioassay. *Organohalogen Compounds*, **45**, 220-223
- Berg, P., Pongratz, I. (2001) Differential usage of nuclear export sequences regulates intracellular localization of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 43231-43238
- Billinton, N., Knight, A.W. (2001) Seeing the wood through the trees: A review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Anal. Biochem.* **291**, 175-197
- Birnbaum, L.S., Staskal, D.F., Diliberto, J.J. (2003) Health effects of polybrominated dibenzo-*p*-dioxins (PBDDs) und dibenzofurans (PBDFs). *Environmental International*, **29**, 855 – 860
- Bjeldanes, L.F., Kim, J.Y., Grose, K.R., Bartholomew, J.C., Bradfield, C.A. (1991) Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol *in vitro* and *in vivo*: Comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**, 9543-9547
- Black, V.H., Quattrochi, L.C. (2004) Molecular cloning of the guinea pig CYP1A2 gene 5'-flanking region: identification of functional aromatic hydrocarbon response element and characterization of CYP1A2 expression in GPC16 cells. *Drug Metabolism and Disposition DMD*, **32**, 595-602
- Blanz, J., Ehninger, G., Zeller, K.P. (1989) The isolation and identification of indigo and indirubin from urine of a patient with leukemia. *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.* **64**, 145-156
- Bobbitt, J.M., Willis, J.P. (1980) Electrochemistry of natural products. 7. Oxidative decarboxylation of some tetrahydro- $\beta$ -carbolinecarboxylic acids. *J. Org. Chem.* **45**, 1978-1984
- Bohonowych, J.E., Rogers, J.M., Jeuken, A., Denison, M.S. (2000) Activation of Ah and estrogen receptor-based cell bioassay systems by extracts of natural dietary herbal supplements. *Organohalogen compounds*, **45**, 240-243
- Bosin, T.R., Borg, S., Faull, K.F. (1989) Harman in rat brain, lung and human CSF: Effect of alcohol consumption. *Alcohol*, **5**, 505-511
- Bosin, T.R., Faull, K.F. (1988) Harman in alcoholic beverages: pharmacological and toxicological implications. *Alcohol.: Clin. Exp. Res.* **12**, 679-682
- Bradfield, C.A., Glover, E., Poland, A. (1991) Purification and N-terminal amino acid sequence of the Ah receptor form the C57BL/6J mouse. *Mol. Pharmacol.* **39**, 13-19
- Bradfield, C.A., Kende, A.S., Poland, A. (1988) Kinetic and equilibrium studies of Ah receptor-ligand binding: use of [<sup>125</sup>I]2-iodo-7,8-dibromodibenzo-*p*-dioxin. *Mol. Pharmacol.* **34**, 229-237
- Bradfield, C.A., Poland, A. (1988) A competitive binding assay for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related ligands of the Ah receptor. *Mol. Pharmacol.* **34**, 682-688
- Braestrup, C., Nielsen, M., Olsen, C.E. (1980) Urinary and brain  $\beta$ -carboline-3-carboxylates as potent inhibitors of brain benzodiazepine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2288-2292

- Breyer-Pfaff, U., Wiatr, G., Stevens, I., Gaertner, H.J., Mundle, G., Mann, K. (1996) Elevated norharman plasma levels in alcoholic patients and controls resulting from tobacco smoking. *Life Sci.* **58**, 1425-1432
- Bringmann, G., Brückner, R., Mössner, R., Feineis, D., Heils, A., Lesch, K. P. (2000) Effects of 1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline (TaClo) on human serotonergic cells. *Neurochem. Res.* **25**, 837-843
- Bringmann, G., God, R., Fähr, S., Feineis, D., Fornadi, K., Fornadi, F. (1999) Identification of the dopaminergic neurotoxin 1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline in human blood after intake of the hypnotic chloral hydrate. *Anal Biochem.* **270**, 167-175
- Bringmann, G., Münchbach, M., Feineis, D., Messer, K., Diem, S., Herderich, M., Clement, H. W., Stichel-Gunkel, C., Kuhn, W. (2002) „Chiral“ and „achiral“ determination of the neurotoxin TaClo (1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline) from blood and urine samples by high-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **767**, 321-332
- Brouwer, A., Ahlborg, U.G., Van den Berg, M., Birnbaum, L.S., Boersma, E.R., Bosveld, B., Denison, M.S., Gray, L.E., Hagmar, L., Holene, E. et al. (1995) Functional aspects of developmental toxicity of polyhalogenated aromatic hydrocarbons in experimental animals and human infants. *Eur. J. Pharmacol. Environ. Toxicol. Pharmacol. Section*, **293**, 1-40
- Brouwer, A., Hakansson, H., Kukler, A., van den Berg, K.J., Ahlborg, U.G. (1989) Marked alterations in retinoid homeostasis of Sprague-Dawley rats induced by a single i.p. dose of 10  $\mu$ g/kg of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicology*, **58**, 267-283
- Brown, D.J., Van Obermeire, I., Goeyens, L., Denison, M.S., De Vito, M.J., Clark, G.C. (2004) Analysis of Ah receptor pathway activation by brominated flame retardants. *Chemosphere*, **55**, 1509-1518
- Burbach, K. M., Poland, A., Bradfield, C. A. (1992) Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8185-8189
- Burleson, G.R., Lebec, H., Yang, Y.G., Ibanes, J.D., Pennington, K.N., Birnbaum, L.S. (1996) Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxins (TCDD) on influenza virus host resistance in mice. *Fund. Appl. Toxicol.* **29**, 40-47
- Busquets, R., Bordas, M., Toribio, F., Puignou, L., Galceran, M.T. (2004) Occurrence of heterocyclic amines in several home-cooked meat dishes of the Spanish diet. *J. Chromatography B*, **802**, 79-86
- Canivenc-Lavier, M.C., Vernevaux, M.F., Totis, M., Siess, M.H., Magdalou, J., Suschetet, M. (1996) Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicology*, **114**, 19-27
- Carlson, D.B., Perdew, G.H. (2002) A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **16**, 317-325

- Carver, L.A., Bradfield, C.A. (1997) Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **272**, 11452-11456
- Carver, L. A., Hogenesch, J. B., Bradfield, C. A. (1994) Tissue specific expression of the rat Ah-receptor and ARNT mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **22**, 3038-3044
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, **263**, 802-805
- Chan, W.K., Yao, G., Gu, Y., Bradfield, C.A. (1999) Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **274**, 12115-12123
- Chang, C., Smith, D.R., Prasad, V.S., Sidman, C.L., Nebert, D.W., Puga, A. (1993) Ten nucleotide differences, five of which cause amino acid changes, are associated with the Ah receptor locus polymorphism of C57BL/6 and DBA/2 mice. *Pharmacogenetics*, **3**, 312-321
- Chapman-Smith, A., Lutwyche, J.K., Whitelaw, M.L. (2004) Contribution of the Per/Arnt/Sim (PAS) domains to DNA binding by basic helix-loop-helix PAS transcriptional regulators. *J. Biol. Chem.* **279**, 5353-5362
- Chen, Y.C., Yu, M.L., Rogan, W.J., Gladen, B.C., Hsu, C.C. (1994) A 6-year follow-up of behavior and activity disorders in the Taiwan Yu-cheng children. *Am. J. Public Health*, **84**, 415-421
- Chen, Y.H., Riby, J., Srivastava, P., Bartholomew, J., Denison, M., Bjeldanes, L. (1995) Regulation of CYP1A1 by Indolo[3,2-b]carbazole in murine hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 22548-22555
- Ciolino, H.P., Daschner, P.J., Yeh, G.C. (1999) Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem. J.* **340**, 715-722
- Ciolino, H.P., Wang, T.T.Y., Yeh, G.C. (1998) Diosmin und Diosmetin are agonists of the aryl hydrocarbon receptor that differentially affect cytochrome P450 1A1 activity. *Cancer Res.* **58**, 2754-2760
- Clark, G.C., Taylor, M.J., Tritscher, A.M., Lucier, G.W. (1991) Tumor necrosis factor involvement in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated endotoxin hypersensitivity in C57BL/6J mice congenic at the Ah locus. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **111**, 422-431
- Clemons, J.H., Zacharewski, T.R. (1999) Reporter genes in toxicology. In: *Molecular Biology of the Toxic Response*. Puga, A., Wallace, K.B. (Hrsg.), Taylor & Francis, Philadelphia, 187-204
- Clontech Living Colors® User Manual, PT2040-1, August 2000
- Cooper, S.J. (1987) Bidirectional changes in the consumption of food produced by  $\beta$ -carbolines. *Brain Res. Bull.* **19**, 347-358
- Corish, P., Tyler-Smith, C. (1999) Attenuation of green fluorescent protein in half-life in mammalian cells. *Protein Engineering*, **12**, 1035-1040

- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, **173**, 33-38
- Courtney, K. D., Moore, J. A. (1971) Teratology studies with 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **20**, 396-403
- Cox, E.D., Cook, J.M. (1995) The Pictet-Spengler condensation: a new direction for an old reaction. *Chem. Rev.* **95**, 1797-1842
- Crosby, D.G., Wong, A.S. (1977) Environmental degradation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Science*, **195**, 1337-1338
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., Tsien, R.Y. (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem.* **20**, 448-455
- Current Protocols in Molecular Biology Online (2003) John Wiley & Sons;  
[www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/mrwhome/104554809/HOME](http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/mrwhome/104554809/HOME)
- Current Protocols in Toxicology Online (2004) John Wiley & Sons;  
[www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/mrwhome/104554814/HOME](http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/mrwhome/104554814/HOME)
- Dalton, T.P., Puga, A., Shertzer, H.G. (2002) Induction of cellular oxidative stress by aryl hydrocarbon receptor activation. *Chemico-Biological Interactions*, **141**, 77-95
- Daunert, S., Barrett, G., Feliciano, J.S., Shetty, R.S., Shrestha, S., Smith-Spencer, W. (2000) Genetically engineered whole-cell sensing systems: coupling biological recognition with reporter genes. *Chem. Rev.* **100**, 2705-2738
- Davarinos, N.S., Pollenz, R.S. (1999) Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J. Biol. Chem.* **274**, 28708-28715
- Dekant, W., Vamvakas, S. (2005) Toxikologie für Chemiker und Biologen. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Denis, M., Cuthill, S., Wikstrom, A. C., Poellinger, L., Gustafsson, J. A. (1988) Association of the dioxin receptor with the Mr 90,000 heat shock protein: a structural kinship with the glucocorticoid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**, 801-807
- Denison, M.S., Fine, J., Wilkinson, C.F. (1984) Protamine sulfate precipitation: a new assay for the Ah receptor. *Anal. Biochem.* **142**, 28-36
- Denison, M.S., Heath-Pagliuso, S. (1998) The Ah receptor: A regulator of the biochemical and toxicological actions of structurally diverse chemicals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **61**, 557-568
- Denison, M. S., Nagy, S. R. (2003) Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 309-334

- Denison, M.S., Pandini, A., Nagy, S.R., Baldwin, E.P., Bonati, L. (2002) Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chemico-Biological Interactions*, **141**, 3-24
- Denison, M.S., Phelan, D., Elferink, C.F. (1998a) The Ah receptor signaling transduction pathway. In: *Toxicant-Receptor Interactions*. Denison, M.S., Helderich, W.G. (Hrsg.), Taylor & Francis, Philadelphia, 3-33
- Denison, M., Rogers, W., Bohonowych, J., Zhao, B. (2004a) Promiscuous ligand-dependent activation of the Ah Receptor: chemicals in crude extracts from commercial and consumer products bind to and activate the Ah Receptor and Ah Receptor-dependent gene expression. *Organohalogen Compounds*, **66**, 2966-2972
- Denison, M.S., Seidel, S.D., Rogers, W.J., Ziccardi, M., Winter, G.M., Heath-Pagliuso, S. (1998b) Natural and synthetic ligands for the Ah receptor. In: *Molecular Biology of the Toxic Response*. Puga, A., Wallace, K. B. (Hrsg.), Taylor & Francis, Philadelphia, 393-410
- Denison, M. S., Yao, E. F. (1991) Characterization of the interaction of transformed rat hepatic cytosolic Ah receptor with a dioxin responsive transcriptional enhancer. *Arch. Biochem. Biophys.* **284**, 158-166
- Denison, M.S., Whitlock, Jr., J.P. (1995) Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J. Biol. Chem.* **270**, 18175-18178
- Denison, M.S., Zhao, B., Baston, D.S., Clark, G.C., Murata, H., Han, D. (2004b) Recombinant cell bioassay systems for the detection and relative quantification of halogenated dioxins and related chemicals. *Talanta*, **63**, 1123-1133
- De Matteis, F., Dawson, S.J., Boobis, A.R. Comoglio, A. (1991) Inducible bilirubin-degradation system of rat liver microsomes: role of cytochrome P4501A1. *Mol. Pharmacol.* **40**, 686-691
- De Wet, J.R., Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R., Subramani, S. (1987) Firefly luciferase gene: Structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **7**, 725-737
- Diem, S. (2001) Enzymatische und chemische Glykosylierung von Tryptophan: Identifizierung und Charakterisierung neuer Tryptophan-Glykoderivate, Dissertation, Universität Würzburg
- Diem, S., Gutsche, B., Herderich, M. (2001) Degradation of tetrahydro- $\beta$ -carbolines in the presence of nitrite: HPLC-MS analysis of the reaction products. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5993-5998
- Diem, S., Herderich, M. (2001a) Reaction of tryptophan with carbohydrates: identification and quantitative determination of novel  $\beta$ -carboline alkaloids in food. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2486-2492
- Diem, S., Herderich, M. (2001b) Reaction of tryptophan with carbohydrates: mechanistic studies on the formation of carbohydrate-derived  $\beta$ -carbolines. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5473-5478
- Dolwick, K. M., Schmidt, J. V., Carver, L. A., Swanson, H. I., Bradfield, C. A. (1993a) Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol. Pharmacol.* **44**, 911-917

- Dolwick, K.M., Swanson, H.I., Bradfield, C.A. (1993b) *In vitro* analysis of Ah receptor domains involved in ligand-activated DNA recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8566-8570
- El-Fouly, M.H., Richter, C., Giesy, J.P., Denison, M.S. (1994) Production of a novel recombinant cell line for use as a bioassay system for detection of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-like chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* **13**, 1581-1588
- Ema, M., Ohe, N., Suzuki, M., Mimura, J., Sogawa, K., Ikawa, S., Fujii-Kuriyama, Y. (1994) Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human aryl hydrocarbon receptors. *J. Biol. Chem.* **269**, 27337-27343
- Ema, M., Sogawa, K., Watanabe, N., Chujoh, Y., Matsushita, N., Gotoh, O., Funae, Y., Fujii-Kuriyama, Y. (1992) cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 246-253
- Enan, E., Matsumura, F. (1994) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-induced changes in glucose transporting activity in guinea pig, mice, and rats *in vivo* and *in vitro*. *J. Biochem. Toxicol.* **9**, 97-106
- Enan, E., Matsumura, F. (1996) Identification of c-src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 1599-1612
- Fan, F., Yan, B., Wood, G., Viluksela, M., Rozman, K.K. (1997) Cytokines (IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ ) in relation to biochemical and immunological effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in rats. *Toxicology*, **116**, 9-16
- Favreau, L.V., Pickett, C.B. (1991) Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H:quinone reductase gene. Identification of regulatory elements controlling basal level expression and inducible expression by planar aromatic compounds and phenolic antioxidants. *J. Biol. Chem.* **266**, 4556-4561
- Fekkes, D., Tuiten, A., Bom, I., Pepplinkhuizen, L. (2001a) Pharmacokinetics of the  $\beta$ -carboline norharman in man. *Life Sci.* **69**, 2113-2121
- Fekkes, D., Tuiten, A., Bom, I., Pepplinkhuizen L. (2001b) Tryptophan: a precursor for the endogenous synthesis of norharman in man. *Neurosci. Lett.* **202**, 145-148
- Felton, J.S., Jägerstad, M., Knize, M.G., Skog, K., Wakabayashi, K., (2000) Contents in Food, Beverages and Tobacco. In: *Food Borne Carcinogens - Heterocyclic Amines*. Nagao, M., Sugimura, T. (Hrsg.), Wiley, Chicester, 31-71
- Fernandez-Salguero, P. M., Hilbert, D. M., Rudikoff, S., Ward, J. M., Gonzalez, F. J. (1996) Aryl hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **140**, 173-179

- Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D.M., McPhail, T., Lee, S.S., Kimura, S., Nebert, D.W., Rudikoff, S., Ward, J.M., Gonzalez, F.J. (1995) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science*, **268**, 722-726
- Ferretti, V., Gilli, P., Borea, P.A. (2004) Structural features controlling the binding of  $\beta$ -carbolines to the benzodiazepine receptor. *Acta Cryst. B*, **60**, 481-489
- Fiedler, H. (1998) Quellen, Reservoirire und Umweltbelastungen von Böden und Sedimenten. In: *Handbuch Dioxine: Quellen, Vorkommen, Analytik*. Oehme, M. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1-72
- Fletcher, N., Hanberg, A., Hakansson, H. (2001) Hepatic vitamin A depletion is a selective marker of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) exposure in four rodent species. *Toxicol. Sci.* **62**, 166-175
- Franc, M.A., Pohjanvirta, R., Toumisto, J., Okey, A.B. (2001a) Persistent, low-dose 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure: effect on aryl hydrocarbon receptor expression in a dioxin-resistance model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **175**, 43-53
- Franc, M.A., Pohjanvirta, R., Toumisto, J., Okey, A.B. (2001b) *In vivo* up-regulation of aryl hydrocarbon receptor expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in a dioxin-resistant rat model. *Biochem. Pharmacol.* **62**, 1565-1578
- Frueh, F.W., Hayashibara, K.C., Brown, P.O., Whitlock Jr., J.P. (2001) Use of cDNA micro-arrays to analyze dioxin-induced changes in human liver gene expression. *Toxicol. Lett.* **122**, 189– 203
- Fukunaga, B.N., Probst, M.R., Reisz-Porszasz, S., Hankinson, O. (1995) Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* **270**, 29270-29278
- Fukushima, S., Matsubara, K., Akane, A., Shiono, H. (1992) 1-Methyl-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid is present in the rat brain and is not increased after acute ethanol injection with cyanamide treatment. *Alcohol*, **9**, 31-35
- Fürst, P. (1998) Dioxine in Lebensmitteln. In: *Handbuch Dioxine: Quellen, Vorkommen, Analytik*. Oehme, M. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 227-266
- Gaido, K.W., Maness, S.C., Leonard, L.S., Greenlee, W.F. (1992) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-dependent regulation of transforming growth factors- $\alpha$  and - $\beta_2$  expression in a human keratinocyte cell line involves both transcriptional and posttranscriptional control. *J. Biol. Chem.* **267**, 24591-24595
- Gambone, C.J., Hutcheson, J.M., Gabriel, J.L., Beard, R.L., Chandraratna, R.A.S., Soprano, K.J., Soprano, D.R. (2002) Unique property of some synthetic retinoids: Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway. *Mol. Pharmacol.* **61**, 334–342
- Garrison, P.M., Tullis, K., Aarts J.M., Brouwer, A., Giesy, J.P., Denison, M.S. (1996) Species-specific recombinant cell lines as bioassay systems for the detection of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-like chemicals. *Fundam. Appl. Toxicol.* **30**, 194-203

- Gasiewicz, T.A., Holscher, M.A., Neal, R.A. (1980) The effect of total parenteral nutrition on the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **54**, 469-488
- Gasiewicz, T.A., Kende, A.S., Rucci, G., Whitney, B., Willey, J.J. (1996) Analysis of structural requirements for Ah receptor agonist activity: ellipticines, flavones, and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 1787-1803
- Gasiewicz, T.A., Neal, R.A. (1982) The examination and quantitation of tissue cytosolic receptors for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin using hydroxylapatite. *Anal. Biochem.* **124**, 1-11
- Gasiewicz, T.A., Rucci, G. (1991)  $\alpha$ -Naphthoflavone acts as an antagonist of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin by forming an inactive complex with the Ah receptor. *Mol. Pharmacol.* **40**, 607-612
- Ge, N.L., Elferink, C.J. (1998) A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin signaling to the cell cycle. *J. Biol. Chem.* **273**, 22708-22713
- Gerlach, M., Xiao, A.Y., Heim, C., Lan, J., God, R., Feineis, D., Bringmann, G., Riederer, P., Sontag, K.H. (1998) 1-Trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline increases extracellular serotonin and stimulates hydroxyl radical production in rats. *Neurosci. Lett.* **257**, 17-20
- Geusau, A., Abraham, K., Geissler, K., Sator, M.O., Stingl, G., Tschachler, E. (2001) Severe 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) intoxication: clinical and laboratory effects. *Environ. Health Perspect.* **109**, 865-869
- Giannone, J.V., Li, W., Probst, M., Okey, A. (1998) Prolonged depletion of Ah receptor without alteration of receptor mRNA levels after treatment of cells in culture with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 489-497
- Giannone, J.V., Okey, A.B., Harper, P.A. (1995) Characterization of polyclonal antibodies to the aromatic hydrocarbon receptor. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **73**, 7-17
- Gillam, E.M.J., Aguinaldo, A.M.A., Notley, L.M., Kim, D., Mundkowski, R.G., Volkov, A.A., Arnold, F.H., Soucek, P., DeVoss, J.J., Guengerich, F.P. (1999) Formation of indigo by recombinant mammalian cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 469-472
- Gillam, E.M.J., Notley, L.M., Cai, H., De Voss, J.J., Guengerich, F.P. (2000) Oxidation of indole by cytochrome P450 enzymes. *Biochemistry*, **39**, 13817-13824
- Gillner, M., Bergman, J., Cambillau, C., Alexandersson, M., Fernström, B., Gustafsson, J.A. (1993) Interactions of indolo[3,2-*b*]-carbazoles and related polycyclic aromatic hydrocarbons with specific binding sites for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rat liver. *Mol. Pharmacol.* **44**, 336-345
- Gillner, M., Bergman, J., Cambillau, C., Gustafsson, J.A. (1989) Interactions of rutaecarpine alkaloids with specific binding sites for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rat. *Carcinogenesis*, **10**, 651-654

- Goerz, G., Barnstorf, W., Winnekendonk, G., Bolsen, K., Fritsch, C., Kalba, K., Tsambaos, D. (1996) Influence of UVA und UVB irradiation on hepatic and cutaneous P450 isoenzymes. *Arch. Dermatol. Res.* **289**, 46-51
- Göttlicher, M. (2004) Transkriptionsfaktoren als zelluläre Angriffspunkte von Giftstoffen. In: *Lehrbuch der Toxikologie*. Marquardt, H., Schäfer, S. (Hrsg.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 257-270
- Gonzalez, F.J., Tukey, R.H., Nebert, D.W. (1984) Structural gene products of the Ah locus. Transcriptional regulation of cytochrome P1-450 und P3-450 mRNA levels by 3-methylcholanthrene. *Mol. Pharmacol.* **26**, 117-121
- Gooderham, N.J., Murray, S., Lynch, A.M., Yahollahi-Farsani, M., Zhao, K., Boobis, A.R., Davies, D.S. (2001) Food-derived heterocyclic amine mutagens: variable metabolism and significance to humans. *Drug Metabolism and Disposition DMD*, **29**, 529-534
- Gradelet, S., Astorg, P., Leclerc, J., Chevalier, J., Vernevault, M.F., Siess, M.H. (1996a) Effects of canthaxanthin, astaxanthin, lycopene and lutein on liver xenobiotic-metabolizing enzymes in the rat. *Xenobiotica*, **6**, 49–63
- Gradelet, S., Astorg, P., Pineau, T., Canivenc, M.C., Siess, M.H., Leclerc, J., Lesca, P. (1997) Ah receptor dependent CYP1A induction by two carotenoids, canthaxanthin and  $\beta$ -apo-8'-carotenal, with no affinity for the TCDD binding site. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 307–315
- Gradelet, S., Leclerc, J., Siess, M.H., Astorg, P.O. (1996b)  $\beta$ -Apo-8'-carotenal, but not  $\beta$ -carotene, is a strong inducer of liver cytochromes P4501A1 and 1A2 in rat. *Xenobiotica*, **26**, 909–919
- Gray Jr., L. E., Kelce, W. R., Monosson, E., Ostby, J. S., Birnbaum, L. S. (1995) Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters: Reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **131**, 108–118
- Gray Jr., L. E., Wolf, C., Mann, P., Ostby, J. S. (1997) *In utero* exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) alters reproductive development of female Long Evans Hooded rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **146**, 237–244
- Grella, B., Teitler, M., Smith, C., Herrick-Davis, K., Glennon, R.A. (2003) Binding of  $\beta$ -carbolines at 5-HT<sub>2</sub> serotonin receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **13**, 4421-4435
- Grose, K.R., Bjeldanes, L.F. (1992) Oligomerization of indole-3-carbinol in aqueous acid. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 188-193
- Gross, G.A., Grüter, A. (1992) Quantitation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic aromatic amines in food products. *J. Chromatogr. A* **592**, 271-278
- Grote, C., Clement, H. W., Wesemann, W., Bringmann, G., Feineis, D., Riederer, P., Sontag, K.H. (1995) Biochemical lesions of the nigrostriatal system by TaClo (1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline) and derivatives. *J. Neural Transm. Suppl.* **46**, 275-281

- Gu, Y.Z., Hogenesch, J. B., Bradfield, C. A. (2000) The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 519-561
- Guan, Y., Louis, E.D., Zheng, W. (2001) Toxicokinetics of tremorogenic natural products, harmaline and harmine, in male sprague-dawley rats. *J. Toxicol. Environ. Health A*, **64**, 645-660
- Guengerich, F.P., Martin, M.V., McCormick, W.A., Nguyen, L.P., Glover, E., Bradfield, C.A. (2004) Aryl hydrocarbon receptor response to indigoids *in vitro* and *in vivo*. *Arch. Biochem. Biophys.* **423**, 309-316
- Gutsche, B. (1999) On-line Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie zur Analytik bioaktiver Tryptophanderivate: Ein Beitrag zum Vorkommen und zur Bedeutung verarbeitungsbedingter Alkaloide in Lebensmitteln, Dissertation, Universität Würzburg.
- Gutsche, B., Grun, C., Scheutzwow, D., Herderich, M. (1999) Tryptophan glycoconjugates in food and human urine. *Biochem. J.* **343**, 11-19
- Gutsche, B., Herderich, M. (1997a) HPLC-MS/MS profiling of tryptophan derived alkaloids in food: Identification of tetrahydro- $\beta$ -carboline-dicarboxylic acids. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2458-2462
- Gutsche, B., Herderich, M. (1997b) High performance liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) for the analysis of 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline derivatives. *J. Chromatogr. A*, **767**, 101-106
- Gutsche, B., Herderich, M. (1998) HPLC-MS/MS identification of tryptophan-derived tetrahydro- $\beta$ -carboline derivatives in food. *Fresenius J. Anal. Chem.* **360**, 836-839
- Hada, N., Totsuka, Y., Enya, T., Tsurumaki, K., Nakazawa, M., Kawahara, N., Murakami, Y., Yokoyama, Y., Sugimura, T. (2001) Structures of mutagens produced by the co-mutagen norharman with o- and m-toluidine isomers. *Mutat. Res.* **493**, 115-126
- Hahn, M.E. (2001) Dioxin toxicology and the aryl hydrocarbon receptor: insights from fish and other non-traditional models. *Mar. Biotechnol.* **3**, S224 – S238
- Hahn, M.E., Poland, A., Glover, E., Stegeman, J.J. (1994) Photoaffinity labeling of the Ah receptor: Phylogenetic survey of diverse vertebrate and invertebrate species. *Arch. Biochem. Biophys.* **310**, 218-228
- Han, D., Nagy, S.R., Denison, M.S. (2004) Comparison of recombinant cell bioassays for the detection of Ah receptor agonists. *Biofactors*, **20**, 11-22
- Harper, P.A., Giannone, J.V., Okey, A.B., Denison, M.S. (1992) *In vitro* transformation of the human Ah receptor and its binding to a dioxin response element. *Mol. Pharmacol.* **42**, 603-612
- Hashimoto, Y., Kawanishi, K., Moriyasu, M. (1988) Forensic chemistry of alkaloids by chromatographic analysis. F: Harmala Alkaloids. In: *The Alkaloids – Chemistry and Pharmacology*. Brossi, A. (Hrsg.) Vol. 32, Academic Press, San Diego, 40-45

- Heath-Pagliuso, S., Miu, R., Milici, A., Giese, S., Chin, R., Denison, M.S. (2000) Tryptophan metabolites, indole-3-pyruvic acid, DL-3-indolelactic acid, L-kynurenine and kynurenic acid activate Ah receptor signal transduction. *Organohalogen Compounds*, **49**, 289-292
- Heath-Pagliuso, S., Rogers, W.J., Tullis, K., Seidel, S.D., Cenijn, P.H., Brouwer, A., Denison, M.S. (1998) Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry*, **37**, 11508-11515
- Heim, C., Sontag, K.-H. (1997) The halogenated tetrahydro- $\beta$ -carboline „TaClo“: a progressively-acting neurotoxin. *J. Neural Transm. Suppl.* **50**, 107-111
- Heim, R., Tsien, R.Y. (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Biol.* **6**, 178-182
- Helferich, W.G., Denison, M.S. (1991) Ultraviolet photoproducts of tryptophan can act as dioxin agonists. *Mol. Pharmacol.* **40**, 674-678
- Henry, E.C., Kende, A.S., Rucci, G., Totleben, M.J., Willey, J.J., Dertinger, S.D., Pollenz, R.S., Jones, J.P., Gasiewicz, T.A. (1999) Flavone antagonists bind competitively with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) to the aryl hydrocarbon receptor but inhibit nuclear uptake and transformation. *Mol. Pharmacol.* **55**, 716-725
- Herraiz, T. (1996) Occurrence of tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acids in commercial foodstuffs, *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3057-3065
- Herraiz, T. (1998) Occurrence of 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid and 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid in fruit juices, purees, and jams. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 3484-3490
- Herraiz, T. (1999) 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid and 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid in fruits. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4883-4887
- Herraiz, T. (2000a) Tetrahydro- $\beta$ -carbolines, potential neuroactive alkaloids, in chocolate and cocoa. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4900-4904
- Herraiz, T. (2000b) Tetrahydro- $\beta$ -carbolie-3-carboxylic acid compounds in fish and meat: possible precursors of co-mutagenic  $\beta$ -carbolines norharman and harman. *Food Add. Contam.* **17**, 859-866
- Herraiz, T. (2002) Identification and occurrence of the bioactive  $\beta$ -carbolines norharman and harman in coffee brews. *Food Addit. Contam.* **19**, 748-754
- Herraiz, T., Galisteo, J. (2003) Tetrahydro- $\beta$ -carboline alkaloids occur in fruits and fruit juices. Activity as antioxidants and radical scavengers. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7156-7161
- Herraiz, T., Papavergou, E. (2004) Identification and occurrence of tryptamine- and tryptophan-derived tetrahydro- $\beta$ -carbolines in commercial sausages. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 2652-2658
- Hestermann, E.V., Stegeman, J.J., Hahn, M.E. (2000) Serum alters the uptake and relative potencies of halogenated aromatic hydrocarbons in cell culture bioassays. *Toxicol. Sci.* **53**, 316-325

- Hoffer, A., Chang, C., Puga, A. (1996) Dioxin induces transcription of *fos* and *jun* genes by *Ah* receptor-dependent and -independent pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **141**, 238-247
- Hord, N.G., Perdew, G.H. (1994) Physicochemical and immunocytochemical analysis of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: characterization of two monoclonal antibodies to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Mol. Pharmacol.* **46**, 618-624
- Hsu, L.L., Mandell, A.J. (1975) Enzymatic formation of tetrahydro- $\beta$ -carboline from tryptamine and 5-methyltetrahydrofolic acid in rat brain fractions: Regional and subcellular distribution. *J. Neurochem.* **24**, 631-636
- Hu, K., Bunce, N.J. (1999) Metabolism of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and related dioxin-like compounds. *J. Toxicol. Environ. Health, Part B*, **2**, 183-210
- Hümmerich, J., Zohm, C., Pfau, W. (2004) Modulation of cytochrome P450 1A1 by food-derived heterocyclic aromatic amines. *Toxicology*, **199**, 231-240
- Husbands, S.M., Glennon, R.A., Gorgerat, S., Gough, R., Tyacke, R., Crosby, J., Nutt, D.J., Lewis, J.W., Hudson, A.L. (2001)  $\beta$ -carboline binding to imidazoline receptors. *Drug Alcohol Depend.* **64**, 203-208
- Huuskonen, H., Unkila, M., Pohjanvirta, R., Tuomisto, J. (1994) Developmental toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the most TCDD-resistant and -susceptible rat strains. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **124**, 174-180
- IARC (1993) *Some naturally occurring substances: Food items and constituents. Heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 56, IARC Press, Lyon, France, 163-242
- IARC (1997) *Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurnas*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 69, IARC Press, Lyon, France
- Ignar, D.M., Rees, S. (2000) The study of drug-receptor interaction using reporter gene systems in mammalian cells. In: *Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 148: The pharmacology of functional, biochemical, and recombinant receptor systems*. Born, G.V.R., Ganten, D., Henken, H., Starke, K., Taylor, P. (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin, 391-414
- Ikuta, T., Eguchi, H., Tachibana, T., Yoneda, Y., Kawajiri, K. (1998) Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* **273**, 2895-2904
- Inouye, K., Ito, T., Fujimaki, H., Takahashi, Y., Takemori, T., Pan, X., Tohyama, C., Nohara, K. (2003) Suppressive Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on the high-affinity antibody response in C57BJ/6 Mice. *Toxicol. Sci.*, **74**, 315-324
- Iurlo, M., Leone, G., Schilström, B., Linner, L., Nomikos, G., Hertel, P., Silvestrini, B., Svensson, H. (2001) Effects of harmine on dopamine output and metabolism in rat striatum: role of monoamine oxidase-A inhibition. *Psychopharmacology (Berl)*, **159**, 98-104

- Jackson, A.H., Jenkins, R.T., Grinstein, M., Ferramola de Sancovich, A.M., Sancovich, H.A. (1988) The isolation and identification of indigoid pigments from urine. *Clin. Chim. Acta*, **172**, 245-252
- Jacobsen, J.L., Jacobsen, S.W. (1996) Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *New Engl. J. Med.* **335**, 783-789
- Jaiswal, A.K. (1994) Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase: gene structure, activity and tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* **269**, 14502-14508
- Jellinck, P.H., Forkert, P.G., Riddick, D.S., Okey, A.B., Michnovicz, J.J., Bradlow, H.L. (1993) Ah receptor binding properties of indole carbinols and induction of hepatic estradiol hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 1129-1136
- Jeong, S.H., Cho, J.H., Park, J.M., Denison, M.S. (2005) Rapid bioassay for the detection of dioxins and dioxin-like PCDFs and PCBs in meat and animal feed. *J. Anal. Toxicol.* **29**, 156-162
- Jeuken, A., Keser, B.J.G., Khan, E., Brouwer, A., Koeman, J., Denison, M.S. (2003) Activation of the Ah receptor by extracts of dietary herbal supplements, vegetables, and fruits. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 5478-5487
- Kafafi, S.A., Afeefy, H.Y., Said, H.K., Kafafi, A.G. (1993) Relationship between aryl hydrocarbon receptor binding, induction of aryl hydrocarbon hydroxylase and 7-ethoxyresorufin O-deethylase enzymes, and toxic activities of aromatic xenobiotics in animals. A new model. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 328-334
- Kamath, A.B., Xu, H., Nagarkatti, P.S., Nargakatti, M. (1997) Evidence for the induction of apoptosis in thymocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin *in vivo*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **142**, 367-377
- Kapitulnik, J., Gonzalez, F.J. (1993) Marked endogenous activation of the CYP1A1 and CYP1A2 genes in the congenitally jaundiced Gunn rat. *Mol. Pharmacol.* **43**, 722-725
- Katiyar, S.K., Matsui, M.S., Mukhtar, H. (2000) Ultraviolet-B exposure of human skin induces cytochromes P450 1A1 and 1B1. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 328-333
- Kazlauskas, A., Poellinger L., Pongratz, I. (1999) Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *J. Biol. Chem.* **274**, 13519-13524
- Kazlauskas, A., Poellinger, L., Pongratz, I. (2000) The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 41317-41324
- Kazlauskas, A., Sundstrom, S., Poellinger, L., Pongratz, I. (2001) The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2594-2607
- Kelley, S.K., Nilsson, C.B., Green, M.H., Green, J.B., Hakansson, H. (2000) Mobilization of vitamin A stores in rats after administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: A kinetic analysis. *Toxicol. Sci.* **55**, 478-484

- Kennedy, S.W., Lorenzen, A., James, C.A., Collins, B.T. (1993) Ethoxyresorufin-O-deethylase and porphyrin analysis in chicken embryo hepatocyte cultures with a fluorescence multiwell plate reader. *Anal. Biochem.* **211**, 102-112
- Kerkvliet, N. I., Shepherd, D. M., Baecher-Steppan, L. (2002) T lymphocytes are direct, aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependent targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD): AhR expression in both CD<sup>4+</sup> and CD<sup>8+</sup> T cells is necessary for full suppression of a cytotoxic T lymphocyte response by TCDD. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **185**, 146–152
- Kim, H., Sablin, S.O., Ramsay, R.R. (1997) Inhibition of monoamine oxidase A by  $\beta$ -carboline derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* **337**, 137-142
- Kimbrough, R.D., Falk, H., Stehr, P., Fries, G. (1984) Health implications of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) contamination of residential soil. *J. Toxicol. Environ. Health*, **14**, 47-93
- Kleinbauer, S., Rabache, M. (1990) The carboline formation by tryptophan or protein heat treatments. *Sci. Ali.* **10**, 417-428
- Kleman, M., Gustafsson, J.A. (1996) Interactions of procarcinogenic heterocyclic amines and indolocarbazoles with the dioxin receptor. *Biol. Chem.* **377**, 741-762
- Kleman, M.I., Övervik, E., Mason, G.G.F., Gustafsson, J.A. (1992) *In vitro* activation of the dioxin receptor to a DNA-binding form by food-borne heterocyclic amines. *Carcinogenesis*, **13**, 1619-1624
- Kleman, M.I., Poellinger, L., Gustafsson, J.-A. (1994) Regulation of human dioxin receptor function by indolocarbazoles, receptor ligands of dietary origin. *J. Biol. Chem.* **269**, 5137-5144
- Knoch, E., Baltes, W. (1992) Model reactions of roast aroma formation: X. Amino acid-specific products after roasting of tryptophan with reducing sugars and sugar degradation products. *Food Chem.* **44**, 243-250
- Ko, H.P., Okino, S.T., Ma, Q., Whitlock Jr., J.P. (1996) Dioxin-induced *CYP1A1* transcription *in vivo*: the aromatic hydrocarbon receptor mediates transactivation, enhancer-promoter communication, and changes in chromatin structure. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 430-436
- Köhler, S., Belkin, S., Schmid, R.D. (2000) Reporter gene bioassays in environmental analysis. *Fresenius J. Anal. Chem.* **366**, 769-779
- Kolluri, S.K., Weiss, C., Koff, A., Göttlicher, M. (1999) p27<sup>Kip1</sup> induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes Dev.* **13**, 1742– 1753
- Korkalainen, M., Tuomisto, J., Pohjanvirta, R. (2001) The Ah receptor of the most dioxin-sensitive species, guinea pig, is highly homologous to the human Ah receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 1121-1129

- Koss, G. (2004) Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK). In: *Lehrbuch der Toxikologie*. Marquardt, H., Schäfer, S. (Hrsg.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 592-601
- Kraemer, S.A., Arthur, K.A., Denison, M.S., Smith, W.L., DeWitt, D.L. (1996) Regulation of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Arch. Biochem. Biophys.* **330**, 319–328
- Kuhn, W., Müller, T., Große, H., Rommelspacher, H. (1995) Plasma levels of the  $\beta$ -carbolines harman and norharman in Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand.* **92**, 451-454
- Kumar, M.B., Ramadoss, P., Reen, R.K., Vanden Heuvel, J.P., Perdew, G.H. (2001) The Q-rich subdomain of the human Ah receptor transactivation domain is required for dioxin-mediated transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 42302-42310
- Lahvis, G.P., Lindell, S.L., Thomas, R.S., McCuskey, R.S., Murphy, C., Glover, E., Bentz, M., Southard, J., Bradfield, C.A. (2000) Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10442-10447
- Lawrence, B.P., Kerkvliet, N.I. (1998) Role of altered arachidonic acid metabolism in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induced immune suppression in C57Bl/6 mice. *Toxicol. Sci.* **42**, 13–22
- Lees, M.J., Peet, D.J., Whitelaw, M.L. (2003) Defining the role for XAP2 in stabilisation of the dioxin receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 35878-35888
- Levine-Fridman, A., Chen, L., Elferink, C.J. (2004) Cytochrome P4501A1 promotes G<sub>1</sub> phase cell cycle progression by controlling aryl hydrocarbon receptor activity. *Mol. Pharmacol.* **65**, 461-469
- Liem, A.K.D. (1999) Basic aspects of methods for the determination of dioxins and PCBs in foodstuffs and human tissues. *Trends Anal. Chem.* **18**, 429-439
- Liem, A.K.D., Fürst, P., Rappe, C. (2000) Exposure of populations to dioxin related compounds. *Food Addit. Contam.* **17**, 241-259
- Lindbro, M. C., Poellinger, L., Whitelaw, M. L. (1995) Protein-protein interaction via PAS domains: role of the PAS domain in positive and negative regulation of the bHLH/PAS dioxin receptor-Arnt transcription factor complex. *EMBO J.* **14**, 3528-3539
- Long, W.P., Pray-Grant, M., Tsai, J.C., Perdew, G.H. (1998) Protein Kinase C activity is required for aryl hydrocarbon receptor pathway-mediated signal transduction. *Mol. Pharmacol.* **53**, 691-700
- Lorick, K.L., Toscano, D.L., Toscano Jr., W.A. (1998) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters retinoic acid receptor function in human keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 749-752
- Louis, E.D., Zheng, W., Jurewicz, E.C., Watner, D., Chen, J., Factor-Litcak, P., Parides, M. (2002) Elevation of blood  $\beta$ -carboline alkaloids in essential tremor. *Neurology*, **59**, 1940-1944

- Lu, Y.F., Santostefano, M., Cunningham, B.D.M., Threadgill, M.D., Safe, S. (1995) 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**, 470-477
- Lu, Y.F., Santostefano, M., Cunningham, B.D.M., Threadgill, M.D., Safe, S. (1996) Substituted flavones as aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonists and antagonists. *Biochem. Pharmacol.* **51**, 1077-1087
- Luebke, R. W., Copeland, C. B., Diliberto, J. J., Akubue, P. I., Andrews, D. L., Riddle, M. M., Williams, W. C., Birnbaum, L. S. (1994) Assessment of host resistance to *Trichinella spiralis* in mice following preinfection exposure to 2,3,7,8-TCDD. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **125**, 7-16
- Ma, Q., Baldwin, K. T. (2000) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway. Role of the transcription activator and DNA binding of AhR. *J. Biol. Chem.* **275**, 8432-8438
- Ma, Q., Whitlock Jr., J.P. (1996) The aromatic hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2144-2150
- Ma, Q., Whitlock Jr., J.P. (1997) A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J. Biol. Chem.* **272**, 8878-8884
- Ma, X., Babish, J.G., (1993) Acute 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure results in enhanced tyrosylphosphorylation and expression of murine hepatic cyclin dependent kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 1070-1077
- Marquardt, H., Schäfer, S. (Hrsg.) (2004) Lehrbuch der Toxikologie, 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
- Matikainen, T., Perez, G.I., Jurisicova, A., Pru, J.K., Schlezinger, J.J., Ryu, H., Laine, J., Sakai, T., Korsmeyer, S.J., Casper, R.F., Sherr, D.H., Tilly, J.L. (2001) Aromatic hydrocarbon receptor-driven *Bax* gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nature Genetics*, **28**, 355-360
- Matsubara, K., Collins, M.A., Akane, A., Ikebuchi, J., Neafsey, E.J., Kagawa, M., Shiono, H. (1993) Potential bioactivated neurotoxicants, *N*-methylated  $\beta$ -carboline ions, are present in human brain. *Brain Res.* **610**, 90-96
- Matsubara, K., Gonda, T., Sawada, H., Uenzono, T., Kobayashi, Y., Kawamura, T., Ohtaki, K., Kimura, K., Akaike, A. (1998) Endogenously occurring  $\beta$ -carboline induce Parkinsonism in nonprimate animals: a possible causative protoxin in idiopathic Parkinson's Disease. *J. Neurochem.* **70**, 727-735

- Matsubara, K., Kobayashi, S., Kobayashi, Y., Yamashita, K., Koide, H., Hatta, M., Iwamoto, K., Tanaka, O., Kimura, K. (1995)  $\beta$ -Carbolinium cations, endogenous MPP<sup>+</sup> analogs, in the lumbar cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Neurology*, **45**, 2240-2245
- Matsubara, K., Neafsey, E.J., Collins, M.A. (1992) Novel S-adenosylmethionine-dependent indole-N-methylation of  $\beta$ -carbolines in brain particulate fractions. *J. Neurochem.* **59**, 511-518
- McConnell, E.E., Moore, J.A. (1979) Toxicopathology characteristics of the halogenated aromatics. *Ann. N.Y. Acad. Sci USA*, **320**, 138-150
- McConnell, E.E., Moore, J.A., Dalgald, D.W. (1978) Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following a single oral dose. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **43**, 175-187
- Merchant, M., Safe, S. (1995) *In vitro* inhibition of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced activity by  $\alpha$ -naphthoflavone and 6-methyl-1,3,8-trichlorodibenzofuran using an aryl hydrocarbon (Ah)-responsive construct. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 663-669
- Meyer, B.K., Pray-Grant, M.G., Vanden Heuvel, J.P., Perdew, G.H. (1998) Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 978-988
- Micka, J., Milatovich, A., Menon, A., Grabowski, G. A., Puga, A., Nebert, D. W. (1997) Human Ah receptor (AHR) gene: localization to 7p15 and suggestive correlation of polymorphism with CYP1A1 inducibility. *Pharmacogenetics*, **7**, 95-101
- Miller, C.A. (1997) Expression of the human aryl hydrocarbon receptor complex in yeast. Activation of transcription by indole compounds. *J. Biol. Chem.* **272**, 32824-32829
- Miller, C.A. (1999) A human aryl hydrocarbon receptor signaling pathway constructed in yeast displays additive responses to ligand mixtures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **160**, 297-303
- Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y. (1999) Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* **13**, 20-25
- Mimura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T. N., Nakao, K., Ema, M., Sogawa, K., Yasuda, M., Katsuki, M., Fujii-Kuriyama, Y. (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* **2**, 645-654
- Miniero, R., De Felip, E., Ferri, F., di Domenico, A. (2001) An overview of TCDD half-life in mammals and its correlation to body weight. *Chemosphere*, **43**, 839-844
- Mitteilung der Kommission der Europäischen Gemeinschaften an den Rat, das europäische Parlament und den Wirtschafts- und Sozialausschuß vom 24.10.2001: Strategie der Gemeinschaft für Dioxine, Furane und polychlorierte Biphenyle. KOM (2001) 593

- Mizuyachi, K., Son, D., Rozman, K.K., Terranova, P.F. (2002) Alteration of ovarian gene expression in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: reduction of cyclooxygenase-2 in the blockage of ovulation. *Reproductive Tox.* **16**, 299-307
- Mocarelli, P., Brambilla, P., Gerthoux, P.M., Patterson Jr., D.G., Needham, L.L. (1996) Change in sex ratio with exposure to dioxin. *Lancet*, **348**, 409
- Monk, S.A., Denison, M.S., Rice, R.H. (2001) Transient expression of CYP1A1 in rat epithelial cells cultured in suspension. *Arch. Biochem. Biophys.* **393**, 154–162
- Morgan J.E., Whitlock Jr., J.P. (1992) Transcription-dependent and transcription-independent nucleosome disruption induced by dioxin. *Pharmacology*, **89**, 11622-11626
- Mukhtar, H., DelTito, B.J., Matgouranis, P.M., Das, M., Asokan, P., Bickers, D.R. (1986) Additive effects of ultraviolet B and curde coal tar on cutaneous carcinogen metabolism: possible relevance to the tumorigenicity of the Goeckerman regimen. *J. Invest. Dermatol.* **87**, 348-353
- Münzel, P.A., Bookjans, G., Mehner, G., Lehmköster, T., Bock, K.W. (1996) Tissue-specific 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-inducible expression of human UDP-glucuronosyl-transferase UGT1A6. *Arch. Biochem. Biophys.* **335**, 205-210
- Murk, A.J., Legler, J., Denison, M.S., Giesy, J.P., van de Guchte, C., Brouwer, A. (1996) Chemical-activated luciferase gene expression (CALUX): a novel *in vitro* bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water. *Fundam. Appl. Toxicol.* **33**, 149-169
- Nagy, S.R., Sanborn, J.R., Hammock, B.D., Denison, M.S. (2002) Development of a green fluorescent protein-based cell bioassay for the rapid and inexpensive detection and characterization of Ah receptor agonists. *Toxicol. Sci.* **65**, 200-210
- Nazarenko, D.A., Dertinger, S.D., Gasiewicz, T.A. (2001) *In vivo* antagonism of AhR-mediated gene induction by 3'-methoxy-4'-nitroflavone in TCDD-responsive *lacZ* mice. *Toxicol. Sci.* **61**, 256-264
- Nebert, D. W. (1989) The Ah locus: genetic differences in toxicity, cancer, mutation, and birth defects. *Crit. Rev. Toxicol.* **20**, 153-174
- Nebert, D. W., Goujon, F. M., Gielen, J. E. (1972) Aryl hydrocarbon hydroxylase induction by polycyclic hydrocarbons. Simple autosomal dominant trait in the mouse. *Nature*, **236**, 107-110
- Neuhold, L.A., Shirayoshi, Y., Ozato, K., Jones, J.E., Nebert, D.W. (1989) Regulation of mouse CYP1A1 gene expression by dioxin: requirement of two cis-acting elements during induction. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2378-2386
- Nie, M., Blankenship, A.L., Giesy, J.P. (2001) Interactions between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and hypoxia signaling pathways. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **10**, 17-27

- Nii, H. (2003) Possibility of the involvement of 9H-pyrido[3,4-b]indole (norharman) in carcinogenesis via inhibition of cytochrome P450-related activities and intercalation to DNA. *Mutation Research*, **541**, 123-136
- Niswender, K.D., Blackman, S.M., Rohde, L., Magnuson, M.A., Piston, D.W. (1995) Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cells: comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits. *J. Microsc.* **180**, 109-116
- Okey, A.B., Vella, L.M., Harper, P.A. (1989) Detection and characterization of a low affinity form of cytosolic Ah receptor in livers of mice nonresponsive to induction of cytochrome P1-450 by 3-methylcholanthrene. *Mol. Pharmacol.* **35**, 823-830
- Olson, J.R. (2003) Pharmacokinetics of Dioxins and Related Chemicals. In: *Dioxins and Health*. Schechter, A., Gasiewicz, T.A. (Hrsg.), 2. Auflage, Wiley, New Jersey, 191-246
- Olson, J.R., Holscher, M.A., Neal, R.A. (1980) Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the Golden Syrian hamster. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **55**, 67-78
- Olsen, H., Enan, E., Matsumura, F.E. (1998) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin mechanism of action to reduce lipoprotein lipase activity in the 3T3-L1 preadipocyte cell line. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **12**, 29-39
- Omrö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., Remington, S.J. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, **273**, 1392-1395
- Pais, P., Moyano, E., Puignou, L., Galceran, M.T. (1997) Liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry as a routine method for the analysis of mutagenic amines in beef extracts. *J. Chromatogr. A*, **778**, 207-218
- Palermo, C. M., Hernando, J.I.M., Dertinger, S.D., Kende, A.S., Gasiewicz, T.A. (2003) identification of potential aryl hydrocarbon receptor antagonists in green tea. *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 865-872
- Park, S., Henry, E.C., Gasiewicz, T.A. (2000) Regulation of DNA binding activity of the ligand-activated aryl hydrocarbon receptor by tyrosine phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **381**, 302-312
- Perdew, G. H. (1988) Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* **263**, 13802-13805
- Perdew, G.H., Poland, A. (1988) Purification of the Ah receptor form C57BL/6J mouse liver. *J. Biol. Chem.* **263**, 9848-9852
- Petrulis, J. R., Hord, N. G., Perdew, G. H. (2000). Subcellular localization of the aryl hydrocarbon receptor is modulated by the immunophilin homolog hepatitis B virus X-associated protein 2. *J. Biol. Chem.* **275**, 37448-37453

- Pfau, W., Skog, K. (2004) Exposure to  $\beta$ -carbolines norharman and harman. *J. Chromatogr. B*, **802**, 115-126
- Phelan, D.M., Brackney, W.R., Denison, M.S. (1998a) The Ah receptor can bind in the absence of receptor-associated heat-shock protein 90. *Arch. Biochem. Biophys.* **353**, 47-54
- Phelan, D., Winter, G.M., Rogers, W.J., Lam, J.C., Denison, M.S. (1998b) Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin. *Arch. Biochem. Biophys.* **357**, 155-163
- Pimental, R.A., Liang, B., Yee, G.K., Wilhelmsson, A., Poellinger, L., Paulson, K.E. (1993) Dioxin receptor and C/EBP regulate the function of the glutathione S-transferase Ya gene xenobiotic response element. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4365-4373
- Pohjanvirta, R., Korkalainen, M., McGuire, J., Simanainen, U., Juvonen, R., Tuomisto, J.T., Unkila, M., Viluksela, M., Bergman, J., Poellinger, L., Tuomisto, J. (2002) Comparison of acute toxicities of indolo[3,2-b]carbazole (ICZ) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in TCDD-sensitive rats. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 1023-1032
- Pohjanvirta, R., Tuomisto, J. (1994) Short Term Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models. *Pharmacol. Rev.* **46**, 483-549
- Poland, A., Glover, E. (1975) Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Evidence for a receptor mutation in genetically nonresponsive mice. *Mol. Pharmacol.* **11**, 389-398
- Poland, A., Knutson, J.C. (1982) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **22**, 517-554
- Pollenz, R.S. (1996) The aryl-hydrocarbon receptor, but not the Arnt protein is rapidly depleted in hepatic and non-hepatic culture cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Mol. Pharmacol.* **49**, 391-398
- Pollenz, R.S., Barbour, E.R. (2000) Analysis of the complex relationship between nuclear export and aryl hydrocarbon receptor-mediated gene regulation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6095-6104
- Pollenz, R.S., Santostefano, M.J., Klett, E., Richardson, V.M., Necela, B., Birnbaum, L.S. (1998) Female Sprague-Dawley Rats exposed to a single oral dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exhibits sustained depletion of aryl hydrocarbon receptor protein in liver, spleen, thymus, and lung. *Toxicol. Sci.* **42**, 117-128
- Pollenz, R.S., Sattler, C.A., Poland, A. (1994) The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy. *Mol. Pharmacol.* **45**, 428-438
- Pongratz, I., Mason, G. G., Poellinger, L. (1992) Dual roles of the 90-kDa heat shock protein hsp90 in modulating functional activities of the dioxin receptor. Evidence that the dioxin receptor

functionally belongs to a subclass of nuclear receptors which require hsp90 both for ligand binding activity and repression of intrinsic DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* **267**, 13728-13734

Postlind, H., Vu, T.P., Tukey, R.H., Quattrochi, L.C. (1993) Response of human *CYP1*-luciferase plasmids to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and polycyclic aromatic hydro-carbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **118**, 255-262

Potter, C.L., Sipes, I.G., Russell, D.H. (1983) Hypothyroxinemia and hypothermia in rats in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **69**, 89-95

Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.F., Cormier, M.J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene*, **111**, 229-233

Probst, M.R., Reisz-Porszasz, S., Agbunag, R.V., Ong, M.S., Hankinson, O. (1993) Role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in aryl hydrocarbon (dioxin) receptor action. *Mol. Pharmacol.* **44**, 511-518

Promega Technical Bulletin No. 281, Luciferase Assay System, 2002

Puga, A., Barnes, S.J., Dalton, T.P., Chang, C., Knudsen, E.S., Maier, M.A. (2000) Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* **275**, 2943-2950

Puga, A., Hoffer, A., Zhou, S., Bohm, J.M., Leikauf, G.D., Shertzer, H.G. (1997) Sustained increase in intracellular free calcium and activation of cyclooxygenase-2 expression in mouse hepatoma cells treated with dioxin. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 1287-1296

Puga, A., Nebert, D.W., Carrier, F. (1992) Dioxin induces expression of *c-fos* and *c-jun* proto-oncogenes and a large increase in transcription factor AP-1. *DNA Cell Biol.* **11**, 269-281

Quattrochi, L.C., Vu, T., Tukey, R.H. (1994) The human *CYP1A2* gene and induction by 3-methylcholanthrene. *J. Biol. Chem.* **269**, 6949-6954

Rannug, A., Rannug, U., Rosenkranz, H.S., Winqvist, L., Westerholm, R., Agurell, E., Grafström, A.K. (1987) 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**, 15422-15427

Rannug, U., Rannug, A., Sjöberg, U., Li, H., Westerholm, R., Bergman, J. (1995) Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands. *Chem. Biol.* **2**, 841-845

Rausch, W.D., Abdel-Mohsen, M., Koutsilieris, E., Chan, W. W., Bringmann, G. (1995) Studies of the potentially endogenous toxin TaClo 1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline in neuronal and glial cell cultures. *J. Neural Transm. Suppl.* **46**, 255-263

Riederer, P., Foley, P., Bringmann, G., Feineis, S., Brückner, R., Gerlach, M. (2002) Biochemical and pharmacological characterization of 1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline: a biologically relevant neurotoxin? *Eur. J. Pharmacol.* **442**, 1-16

- Robertson, J.A., Nebert, D.W., Hankinson, O. (1987) Autoregulation plus positive and negative elements controlling transcription of genes in the [Ah] battery. *Chemica Scripta*, **27A**, 83-87
- Roman, B.L., Pollenz, R.S., Peterson, R.E. (1998) Responsiveness of the adult male rat reproductive tract to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure: Ah receptor and Arnt expression, CYP1A1 induction, and Ah receptor down-regulation. *Tox. Appl. Pharmacol.* **150**, 228-239
- Rommelspacher, H., Bruning, G., Susilo, R., Nick, M., Hill, R. (1985) Pharmacology of harmalan 1-methyl-3,4-dihydro- $\beta$ -carboline. *Eur. J. Pharmacol.* **109**, 363-371
- Rommelspacher, H., May, T., Salewski, B. (1994) Harman (1-methyl- $\beta$ -carboline) is a natural inhibitor of monoamine oxidase type A in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **252**, 51-59
- Rommelspacher, H., Meier-Henco, M., Smolka, M., Kloft, C. (2002) The levels of norharman are high enough after smoking to affect monoamineoxidase B in platelets. *Eur. J. Pharmacol.* **441**, 115-135
- Röner, B., Lerche, H., Bergmüller, W., Freilinger, C., Severin, T., Pischetsrieder, M. (2000) Formation of tetrahydro- $\beta$ -carbolines and  $\beta$ -carbolines during the reaction of L-tryptophan with D-glucose. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2111-2116
- Rushing, S.R., Denison, M.S. (2002) The silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors can interact with the aryl hydrocarbon (Ah) receptor but fails to repress Ah receptor-dependent gene expression. *Arch. Biochem. Biophys.* **403**, 189-201
- Rushmore, T.H., King, R.G., Paulson, K.E., Pickett, C.B. (1990) Regulation of glutathione-S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3826-3830
- Sadek, C.M., Allen-Hoffmann, B.L. (1994) Suspension-mediated induction of hepa-1c1c7 *Cyp1a-1* expression is dependent on the Ah receptor signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **269**, 31505-31509
- Safe, S. (1990) Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs) and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit. Rev. Toxicol.* **21**, 51-88
- Safe, S., Wang, F., Porter, W., Duan, R., McDougal, A. (1998) Ah Receptor agonists as endocrine disruptors: Antiestrogenic activity and mechanism. *Toxicol. Lett.* **102-103**, 343-347
- Sanderson, J.T., Aaarts, J.M., Brouwer, A., Froese, K.L., Denison, M.S., Giesy, J.P. (1996) Comparison of Ah receptor-mediated luciferase and ethoxyresorufin-O-deethylase induction on H4IIE cells: implications for their use as bioanalytical tools for the detection of polyhalogenated aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **137**, 316-325

- Sanderson, J.T., Bellward, G.D. (1995) Hepatic microsomal ethoxyresorufin-O-deethylase-inducing potency *in ovo* and cytosolic Ah receptor binding affinity of 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin: Comparison of four avian species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **132**, 131-145
- Santostefano, M., Merchant, M., Arellano, L., Morrison, V., Denison, M.S., Safe, S. (1993)  $\alpha$ -Naphthoflavone-induced CYP1A1 gene expression and cytosolic aryl hydrocarbon receptor transformation. *Mol. Pharmacol.* **43**, 200-206
- Savouret, J.F., Antenos, M., Quesne, M., Xu, J., Milgrom, E., Casper, R.F. (2001) 7-Ketocholesterol is an endogenous modulator for the aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 3054-3059
- Sawyer, T., Safe, S. (1982) PCB isomers and congeners: induction of aryl hydrocarbon hydroxylase and ethoxyresorufin O-deethylase enzyme activities in rat hepatoma cells. *Toxicol. Letters*, **13**, 87-93
- SCF (2000) Opinion of the Scientific Committee on Food (SCF) on the risk assessment of dioxins and dioxin-like PCBs in food. 22. November 2000; Update 30. Mai 2001
- Schaldach, C.M., Riby, J., Bjeldanes, L.F. (1999) Lipoxin A4: A new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry*, **38**, 7594-7600
- Schmidt, J.V., Carver, L.A., Bradfield, C.A. (1993) Molecular characterization of the murine Ahr gene. Organization, promoter analysis, and chromosomal assignment. *J. Biol. Chem.* **268**, 22203-22209
- Schmidt, J.V., Su, G.H., Reddy, J.K., Simon, M.C., Bradfield, C.A. (1996) Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6731-6736
- Schrenk, D. (1998) Impact of dioxin-type induction of drug-metabolizing enzymes on the metabolism of endo- and xenobiotics. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 1155-1162
- Schrenk, D., Riebinger, D., Till, M., Vetter, S., Fiedler, H.P. (1997) Tryptanthrins: A novel class of agonists of the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 165-171
- Schrenk, D., Riebinger, D., Till, M., Vetter, S., Fiedler, H.P. (1999) Tryptanthrins and other tryptophan-derived agonists of the dioxin receptor. *Adv. Exp. Med. Biol.* **467**, 403-408
- Schuur, A.G., Boekhorst, F.M., Brouwer, A., Visser, T.J. (1997) Extrathyroidal effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on thyroid hormone turnover in male Sprague-Dawley rats. *Endocrinology*, **138**, 3727-3734
- Schwetz, B.A., Norris, J.M., Sparschu, G.L., Rowe, V.K., Gehring, P.J., Emerson, J.L., Gerbig, C.G. (1973) Toxicology of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins. *Environ. Health Perspect.* **5**, 87-99
- Seidel, S.D., Li, V., Winter, G.M., Rogers, W.J., Martinez, E.I., Denison, M.S. (2000) Ah receptor-based chemical screening bioassays: application and limitations of the detection of Ah receptor agonists. *Toxicol. Sci.* **55**, 107-115

- Seidel, S.D., Winters, G.M., Rogers, W.J., Ziccardi, M.H., Li, V., Keser, B., Denison, M.S. (2001) Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **15**, 187-196
- Sen, N.P., Seaman, S.W., Lau, B.P., Weber, D., Lewis, D. (1995) Determination and occurrence of various tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acids and the corresponding *N*-nitroso compounds in foods and alcoholic beverages. *Food Chem.* **54**, 327-337
- Sewall, C.H., Flagler, N., Vanden Heuvel, J.P., Clark, G.C., Tritscher, A.M., Maronpot, R.M., Lucier, G.W. (1995) Alterations in thyroid function in female sprague-dawley rats following chronic treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **132**, 237-244
- Shehin, S.E., Stephenson, R.O., Greenlee, W.F. (2000) Transcriptional regulation of the Human CYP1B1 gene. *J. Biol. Chem.* **275**, 6770-6776
- Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Y., Kume, H., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., Ishikawa, T. (2000) Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 779-782
- Sinal, C.J., Bend, J.R. (1997) Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of CYP1A1 by bilirubin in mouse hepatoma hepa 1c1c7 cells. *Mol. Pharmacol.* **52**, 590-599
- Sindhu, R.K., Reisz-Porszasz, S., Hankinson, O., Kikkawa, Y. (1996) Induction of cytochrome P4501A1 by photooxidized tryptophan in Hepa 1c1c7 cells. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 1883-1893
- Singh, S.S., Hord, N.G., Perdew, G.H. (1996) Characterization of the activated form of the aryl hydrocarbon receptor in the nucleus of HeLa cells in the absence of exogenous ligand. *Arch. Biochem. Biophys.* **329**, 47-55
- Skog, K., Solyakov, A., Arvidsson, P., Jägerstad, M. (1998) Analysis of nonpolar heterocyclic amines in cooked foods and meat extracts using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **803**, 227-233
- Smith, C.J., Qian, X., Zha, Q., Moldoveanu, S.C. (2004) Analysis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carbolines in mainstream smoke of reference cigarettes by chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1046**, 211-216
- Smith, L.M., Stalling, D.L., Johnson, J.L. (1984) Determination of part-per-trillion levels of polychlorinated dibenzofurans and dioxins in environmental samples. *Anal. Chem.* **56**, 1830-1842
- Solyakov, A., Skog, K. (2002) Screening for heterocyclic amines in chicken cooked in various ways. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 1205-1211
- Solyakov, A., Skog, K., Jägerstad, M. (1999) Heterocyclic amines in process flavours, process flavour ingredients, bouillon concentrates and a pan residue. *Food Chem. Toxicol.* **37**, 1-11

- Soprano, D.R., Gambone, C.J., Sheikh, S.N., Gabriel, J.L. Chandraratna, R.A.S., Soprano, K.J., Kochhar, D.M. (2001) The synthetic retinoid AGN 193109 but not retinoic acid elevates CYP1A1 levels in mouse embryos and Hepa-1c1c7 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **174**, 153-159
- Spijkerman, R., Eijnden, R.V.D., Mheen, D.V.D., Bongers, I., Fekkes, D. (2002) The impact of smoking and drinking on plasma levels of norharman. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **12**, 61-71
- Spink, D.C., Katz, B.H., Hussain, M.M., Pentecost, B.T., Cao, Z., Spink, B.C. (2003) Estrogen regulates Ah responsiveness in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis*, **24**, 1941-1950
- Stohler, R., Rommelspacher, H., Ladewig, D., Dammann, G. (1993)  $\beta$ -Carboline (Harman / Norharman) sind bei Heroinabhängigen erhöht. *Therapeutische Umschau*, **50**, 178-181
- Sugihara, K., Kitamura, S., Yamada, T., Okayama, T., Ohta, S., Yamashita, K., Yasuda, M., Fujii-Kuriyama, Y., Saeki, K., Matsui, S., Matsuda, T. (2004) Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of microsomal drug-metabolizing enzyme activity by indirubin and indigo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318**, 571-578
- Sulentic, C.E., Holsapple, M.P., Kaminski, N.E. (2000) Putative link between transcriptional regulation of IgM expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and the aryl hydrocarbon receptor/dioxin-response enhancer signaling pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **295**, 705-716
- Sun, Y.V., Boverhof, D.R., Burgoon, L.D., Fielden, M.R., Zacharewski, T.R. (2004) Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences. *Nucleic Acids Res.* **32**, 4512-4523
- Susilo, R., Damm, H., Rommelspacher, H., Höfle, G. (1987) Biotransformation of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-1-carboxylic acid to harmalan, tetrahydroharman and harman in rats. *Neurosci. Lett.* **81**, 325-330
- Susilo, R., Rommelspacher, H. (1987) Formation of a  $\beta$ -carboline (1,2,3,4-tetrahydro-1-methyl- $\beta$ -carboline-1-carboxylic acid) following intracerebroventricular injection of tryptamine and pyruvic acid. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **335**, 70-76
- Sutter, T.R., Guzman, K., Dold, K.M., Greenlee, W.F. (1991) Targets for dioxin: genes for plasminogen activator inhibitor-2 and interleukin-1beta. *Science*, **254**, 415-418
- Sutter, T.R., Tang, Y.M., Hayes, C.L., Wo, Y.P., Jabs, E.W., Li, X., Yin, H., Cody, C.W., Greenlee, W.F. (1994) Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *J. Biol. Chem.* **269**, 13092-13099
- Swanson, H.I., Chan, W.K., Bradfield, C.A. (1995) DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 26292-26302
- Takahashi, Y., Nakayama, K., Shimojima, T., Itoh, S., Kamataki, T. (1996) Expression of aryl hydrocarbon receptor (AhR) and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) in adult rabbits known to be non-responsive to cytochrome P-450 1A1 (CYP1A1) inducers. *Eur. J. Biochem.* **242**, 512-518

- Takimoto, K., Lindahl, R., Dunn, T.J., Pitot, H.C. (1994) Structure of the 5' flanking region of class 3 aldehyde dehydrogenase in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* **312**, 539-546
- Theobald, H. M., Peterson, R. E. (1997) *In utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: Effects on development of the male and female reproductive system of the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **145**, 124-135
- Thompson, J.F., Hayes, L.S., Lloyd, D.B. (1991) Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation. *Gene*, **103**, 171-177
- Thurmond, T.S., Gasiewicz, T.A. (2000) A single dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin produces a time- and dose-dependent alteration in the murine bone marrow B-lymphocyte maturation profile. *Toxicol. Sci.* **58**, 88-95
- Tian, Y., Ke, S., Denison, M.S., Rabson, A.B., Gallo, M.A. (1999) Ah receptor and NF- $\kappa$ B interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J. Biol. Chem.* **274**, 510-515
- Totsuka, Y., Takamur-Enya, T., Nishigaki, R., Sugimura, T., Wakabayashi, K. (2004) Mutagens formed from  $\beta$ -carbolines with aromatic amines. *J. Chromatogr. B*, **802**, 135-141
- Totsuka, Y., Ushiyama, H., Ishihara, J., Sinha, R., Goto, S., Sugimura, T., Wakabayashi, K. (1999) Quantification of the co-mutagenic  $\beta$ -carbolines, norharman and harman, in cigarette smoke condensates and cooked foods. *Cancer Lett.* **143**, 139-143
- Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509-544
- Tsuchiya, H. (2004) High-performance liquid chromatographic analysis of  $\beta$ -carbolines in human scalp hair. *J. Chromatogr. A*, **1031**, 325-330
- Tsuchiya, H., Hayashi, H., Sato, M., Shimizu, H., Iinuma, M. (1999a) Quantitative analysis of all types of  $\beta$ -carboline alkaloids in medicinal plants and dried edible plants by high performance liquid chromatography with selective fluorometric detection. *Phytochem. Anal.* **10**, 247-253
- Tsuchiya, H., Sato, M., Hayashi, H., Kato, H., Kureshiro, H., Hayashi, T. (1996b) Simultaneous determination of tetrahydro- $\beta$ -carbolines and  $\beta$ -carbolines. *Chromatographia*, **43**, 419-425
- Tsuchiya, H., Shimizu, H., Iinuma, M. (1999b) Beta-carboline alkaloids in crude drugs. *Chem. Pharm. Bull.* **47**, 440-443
- Tsuchiya, H., Yamada, K., Ohtani, S., Takagi, N., Todoriki, H., Hayashi, T. (1995) Determination of tetrahydro- $\beta$ -carbolines in rat brain by gas chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry without interference from artifactual formation. *J. Neurosci. Methods* **62**, 37-41
- Tsuchiya, H., Yamada, K., Tajima, K., Hayashi, T. (1996c) Urinary excretion of tetrahydro- $\beta$ -carbolines relating to ingestion of alcoholic beverages. *Alcohol Alcoholism*, **31**, 197-203
- Tsuchiya, H., Yamada, K., Todoriki, H., Hayashi, T. (1996a) Urinary excretion of tetrahydro- $\beta$ -carbolines influenced by food and beverage ingestion implies their exogenous supply via dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* **7**, 237-242

- Tsutsumi, T., Amakura, Y., Nakamura, M., Brown, D.J., Clark, G.C., Sasaki, K., Toyoda, M., Maitani, T. (2003) Validation of the CALUX bioassay for the screening of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in retail fish. *Analyst*, **128**, 486-492
- Tweedie, D.J., Prough, R.A., Burke, M.D. (1988) Effects of induction on the metabolism and cytochrome P-450 binding of harman and other  $\beta$ -carbolines. *Xenobiotica*, **18**, 785-796
- Ushiyama, H., Oguri, A., Totsuka, Y., Itoh, H., Sugimura, T., Wakabayashi, K. (1995) Norharman and harman in human urine. *Proc. Japan Acad.* **71(B)**, 57-60
- Van Birgelen, A.P., Fase, K.M., van der Kolk, J., Poiger, H., Brouwer, A., Seinen, W., van den Berg, M. (1996) Synergistic effect of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on hepatic porphyrin levels in the rat. *Environ. Health Perspect.* **104**, 550-557
- Vasiliou, V., Kozak, C.A., Lindahl, R., Nebert, D.W. (1996) Mouse microsomal class 3 aldehyde dehydrogenase: AHD3 cDNA sequence, inducibility by dioxin and clofibrate, and genetic mapping. *DNA Cell Biol.* **15**, 235-245
- Vorderstrasse, B. A., Bohn, A. A., and Lawrence, B. P. (2003) Examining the relationship between impaired host resistance and altered immune function in mice treated with TCDD. *Toxicology*, **188**, 15-28
- Vos, J.G., Moore, J.A. (1974) Suppression of cellular immunity in rats and mice by maternal treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **47**, 777-794
- Walker, M. K., Heid, S. E., Smith, S. M., Swanson, H. I. (2000) Molecular characterization and developmental expression of the aryl hydrocarbon receptor from the chick embryo. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* **126**, 305-319
- Waller, C.L., McKinney, J.D. (1995) Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of dioxins and dioxin-like compounds: model validation and Ah receptor characterization. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 847-858
- Wang, W., Smith III, R., Safe, S. (1998) Aryl hydrocarbon receptor-mediated antiestrogenicity of MCF-7 cells: Modulation of hormone-induced cell-cycle enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **356**, 239-248
- Ward, W.W., Cody, C.W., Hart, R.C., Cormier, M.J. (1980) Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in *Renilla* and *Aequorea* green-fluorescent proteins. *Photochem. Photobiol.* **31**, 611-615
- Wei, Y.D., Rannung, U., Rannung, A. (1999) UV-induced CYP1A1 gene expression in human cells is mediated by tryptophan. *Chemico-Biological Interactions*, **188**, 127-140
- Whitelaw, M.L., Gottlicher, M., Gustafsson, J.A., Poellinger, L. (1993b) Definition of a novel ligand binding domain of a nuclear bHLH receptor: co-localization of ligand and hsp90 binding activities within the regulable inactivation domain of the dioxin receptor. *EMBO J.* **12**, 4169-4179

- Whitelaw, M.L., McGuire, J., Picard, D., Gustafsson, J.A. (1995) Heat shock protein hsp90 regulates dioxin receptor function *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4437-4441
- Whitelaw, M.L., Pongratz, I., Wilhelmsson, A., Gustafsson, J. A., Poellinger, L. (1993a) Ligand-dependent recruitment of the Arnt coregulator determines DNA recognition by the dioxin receptor. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2504-2514
- Wille, G., Mayser, P., Thoma, W., Monsees, T., Baumgart, A., Schmitz, H.J., Schrenk, D., Polborn, K., Steglich, W. (2001) Malassezin – A novel Agonist of the aryl hydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **9**, 955-960
- Wodarz, N., Wiesbeck, G.A., Rommelspacher, H., Riederer, P., Böning, J. (1996) Excretion of  $\beta$ -carbolines harman and norharman in 24-hour urine of chronic alcoholics during withdrawal and controlled abstinence. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **20**, 706-710
- Wood, K.V. (1991) The origin of beetle luciferases. In: *Bioluminescence and Chemo-luminescence - Current Status*. Stanley, P.E., Kricka, L.J. (Hrsg.), John Wiley and Sons, Chichester, 11-14
- Yang, F., Moss, L.G., Phillips, Jr. G.N. (1996a) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotech.* **14**, 1246-1251
- Yang, T.T., Cheng, L., Kain, S.R. (1996b) Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4592-4593
- Yao, E.F., Denison, M.S. (1992) DNA sequence determinants for binding of transformed Ah receptor to a dioxin-responsive enhancer. *Biochemistry*, **31**, 5060-5067
- Yaylayan, V., Forage, N. G. (1991) Determination of the kinetics and mechanism of decomposition of tryptophan amadori rearrangement product by RP-HPLC analysis. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 364-369
- Yu, A.M., Idle, J.R., Krausz, K.W., Küpfer, A., Gonzalez, F.J. (2003) Contribution of individual cytochrome P450 isoenzymes to the *O*-demethylation of the psychotropic  $\beta$ -carboline alkaloids harmaline and harmine. *JPET*, **305**, 315-322
- Yuan, J., Manabe, S. (1996) Evaluation of exposure level of *N*-Methyl- $\beta$ -carboline-3-carboxamide (FG 7142), an anxiogenic agent in humans. *Environmental Pollution*, **94**, 267-271
- Zaccaro, C., Sweitzer, S., Pipino, S., Gorman, N., Sinclair, P.R., Sinclair, J.F., Nebert, D.W., De Matteis, F. (2001) Role of cytochrome P450 1A2 in bilirubin degradation studies in *Cyp1a2* (-/-) mutant mice. *Biochem. Pharmacol.* **61**, 843-849
- Zhang, S., Qin, C., Safe, S.H. (2003) Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists / antagonists: Effects of structure and cell context. *Environm. Health Perspect.* **111**, 1877-1882
- Zhao, B., Nagy, S., Roger, J., Nantz, M., Kurth, M., Springsteel, M., Denison, M. (2004) Identification and analysis of novel flavonoid agonists and antagonists for the Ah and estrogen receptor. *Organohalogen Compounds*, **66**, 2960-2965

---

Zhou, J., Henry, E.C., Palermo, C.M., Dertinger, S.D., Gasiewicz, T.A. (2003) Species-specific transcriptional activity of synthetic flavonoids in guinea pig and mouse cells as a result of differential activation of the aryl hydrocarbon receptor to interact with dioxin-responsive elements. *Mol. Pharmacol.* **63**, 915-924

Ziccardi, M.H., Gardner, I.A., Denison, M.S. (2000) Development and modification of a recombinant cell bioassay to directly detect halogenated and polycyclic aromatic hydrocarbons in serum. *Toxicol. Sci.* **54**, 183-193

# Lebenslauf

Name:	Diana Kemmer
Anschrift:	Gartenstraße 8 97268 Kirchheim
Geburtsdatum:	21. Dezember 1975
Geburtsort:	Würzburg
Familienstand:	ledig
09 / 1986 – 06 / 1995	Städtisches Schönborngymnasium Würzburg Allgemeine Hochschulreife
11 / 1995 – 05 / 2000	Studium der Lebensmittelchemie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
29. Mai 2000	Erste Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
03 / 1996 – 05 / 2000	Stipendiatin der Hochschulförderung der Hanns-Seidel- Stiftung e.V., München
09 / 2000 – 12 / 2000	Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Universität Würzburg
01 / 2001 – 12 / 2003	Anfertigung der Promotionsarbeit am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Markus Herderich
02 / 2004 - 07 / 2004	Praktischer Ausbildungsabschnitt zur zweiten Staatsprüfung am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Erlangen
30. Juli 2004	Zweite Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
seit 1. Mai 2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fraunhofer-Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung, Freising

# Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Natürliche Lebensmittelinhaltsstoffe als Liganden des Ah Rezeptors – Identifizierung und Charakterisierung von  $\beta$ -Carbolinen mit AhR Ligandenpotential mittels funktioneller Bioassays“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Diana Kemmer