

**Der Einfluss des circadianen Rhythmus  
auf die Sensitivität von *in vitro*  
Testsystemen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Johanna Ndikung

Berlin 2020

Die vorliegende Arbeit wurde unter am Bundesinstitut für Risikobewertung im Zeitraum zwischen November 2014 und Januar 2020 angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Gilbert Schöfelder

Zweitgutachter: Prof. Dr. Florian Heyd

Tag der Disputation: 12.06.2020

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Der circadiane Rhythmus.....	1
1.2	Der circadiane Rhythmus im Säugetier .....	2
1.2.1	Molekularer Mechanismus des circadianen Rhythmus im Säugetier .....	2
1.2.2	Circadiane Rhythmen in physiologischen Prozessen .....	6
1.3	Fremdstoffmetabolismus.....	10
1.3.1	Circadiane Regulation des Fremdstoffmetabolismus.....	11
1.3.2	Chronopharmakologie .....	16
1.3.3	Chronotoxikologie .....	17
1.4	Fragestellung/ Zielsetzung .....	21
2	Material & Methoden .....	22
2.1	Material .....	22
2.1.1	Allgemeines Equipment.....	22
2.1.2	Substanzen und Lösungen .....	24
2.1.3	Zellkultur.....	26
2.1.4	Molekularbiologie .....	28
2.1.5	Software .....	30
2.2	Methoden .....	31
2.2.1	Zellkultur.....	31
2.2.2	Kultivierung und Expansion .....	31
2.2.3	Circadianes Biolumineszenz-Reportersystem.....	33
2.2.4	Genexpressions-Analysen.....	35
2.2.5	Proteinexpressions-Analysen .....	36
2.2.6	Enzymaktivitätsbestimmung .....	37
2.2.7	mRNA-Stabilitätsmessung.....	37
2.2.8	Analyse der Promotoraktivität .....	37
2.2.9	Auswertung.....	38
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Charakterisierung der HME1 Zelllinie.....	39
3.1.1	Genexpression der Clockgene.....	39
3.1.2	Generierung von Biolumineszenz-Reporterzelllinien .....	40

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.3	Responsivität der Zelllinie.....	41
3.1.4	Vergleich der Verwendbarkeit verschiedener Entrainment-Protokolle für das Testsystem.....	47
3.1.5	Hemmung des circadianen Rhythmus durch spezifische Inhibitoren.....	51
3.2	AHR-Agonisten interferieren nicht mit zellulärem Rhythmus .....	53
3.3	Entrainment führt zu verstärkter Response in HME1-Zellen nach Substanzexposition .....	55
3.3.1	Testung zusätzlicher AHR-Agonisten.....	56
3.3.2	Verifizierung der Ergebnisse mittels weiterer Zielgene .....	59
3.3.3	Expressionsanalysen des <i>AHR</i> zeigen keine Beeinflussung im Testsystem.....	62
3.3.4	Verifizierung der verstärkten Response in weiteren Zelllinien .....	63
3.4	Entrainment erhöht die <i>CYP1A1</i> -Enzymaktivität nach TCDD-Behandlung .....	71
3.4.1	Erhöhte <i>CYP1A1</i> -Proteinmenge in synchronisierten Zellen.....	72
3.4.2	Erhöhte <i>CYP1A1</i> -Enzymaktivität durch Entrainment.....	73
3.5	Rhythmische Veränderungen der <i>CYP1A1</i> -Induktion .....	74
3.5.1	Oszillation des basalen <i>CYP1A1</i> -Expressionslevels .....	74
3.5.2	Zeitabhängigkeit der AHR-vermittelten Zellantwort .....	75
3.5.3	Dosisabhängigkeit der circadianen Zellantwort.....	76
3.6	<i>CYP1A1</i> -Induktion ist phasenabhängig.....	77
3.7	<i>CYP1A1</i> -Expressionsregulation in synchronisierten Zellen .....	78
3.7.1	Veränderte mRNA-Stabilität von <i>CYP1A1</i> ist nicht Ursache der gesteigerten Response .....	78
3.7.2	Erhöhte <i>CYP1A1</i> -Promotoraktivität durch Zellsynchronisierung .....	79
4	Diskussion .....	81
4.1	Etablierung eines circadianen <i>in vitro</i> Testsystems .....	81
4.1.1	Visualisierung des circadianen Rhythmus .....	81
4.1.2	Zell-Entrainment <i>in vitro</i> .....	82
4.1.3	Optimierung des Testsystems .....	83
4.2	Testung AHR-aktivierender Xenobiotika an circadianem <i>in vitro</i> Testsystem .....	86

## Inhaltsverzeichnis

---

4.2.1	AHR-Agonisten beeinflussen nicht die Oszillation der Biolumineszenz-Reporter-Zelllinien .....	86
4.2.2	Entrainment erhöht Response auf Xenobiotika .....	87
4.3	Relevanz der Ergebnisse .....	93
4.3.1	Relevanz der Ergebnisse für die Chronopharmakologie .....	93
4.3.2	Relevanz der Ergebnisse für die regulatorische Toxikologie .....	96
4.4	Fazit .....	103
5	Zusammenfassung .....	105
6	Summary .....	107
7	Anhang .....	I
7.1	Literaturverzeichnis .....	I
7.2	Publikationsverzeichnis .....	XX
7.2.1	Publikationen in Fachzeitschriften .....	XX
7.2.2	Posterpräsentationen .....	XX
7.3	Abbildungsverzeichnis .....	XXI
7.4	Tabellenverzeichnis .....	XXIII
7.5	Abkürzungsverzeichnis .....	XXIV
8	Danksagung .....	XXVII
9	Selbstständigkeitserklärung .....	XXVIII



# 1 Einleitung

## 1.1 Der circadiane Rhythmus

Die Erdrotation um ihre eigene Achse bedingt einen immer wiederkehrenden Wechsel der Umweltbedingungen, dem Organismen ausgesetzt sind. Licht, Temperatur und damit u.a. Nahrungsangebot sind lebenswichtige Faktoren, die somit mit einer gleichbleibenden Periode von ungefähr 24 Stunden wechseln. Als phylogenetische Anpassung an diese wechselnden Faktoren entstand der circadiane Rhythmus (circa diem = ungefähr ein Tag) als ein internes Zeitsystem, das eine Antizipation der rhythmischen Veränderungen ermöglicht [1]. Offenbar ergab sich daraus ein evolutionärer Selektionsvorteil, da der circadiane Rhythmus in allen drei Domänen des Lebens, den Archäen, Bakterien und Eukaryonten, vertreten ist [2]. Tatsächlich zeigten Experimente an Cyanobakterien, dass Mutanten mit veränderter Periodenlänge einen selektiven Nachteil gegenüber Cyanobakterien hatten, deren Periode dem Umgebungsrhythmus näher kam [3].

Circadiane Rhythmen werden unabhängig von der Komplexität der Spezies durch drei Eigenschaften charakterisiert [4]:

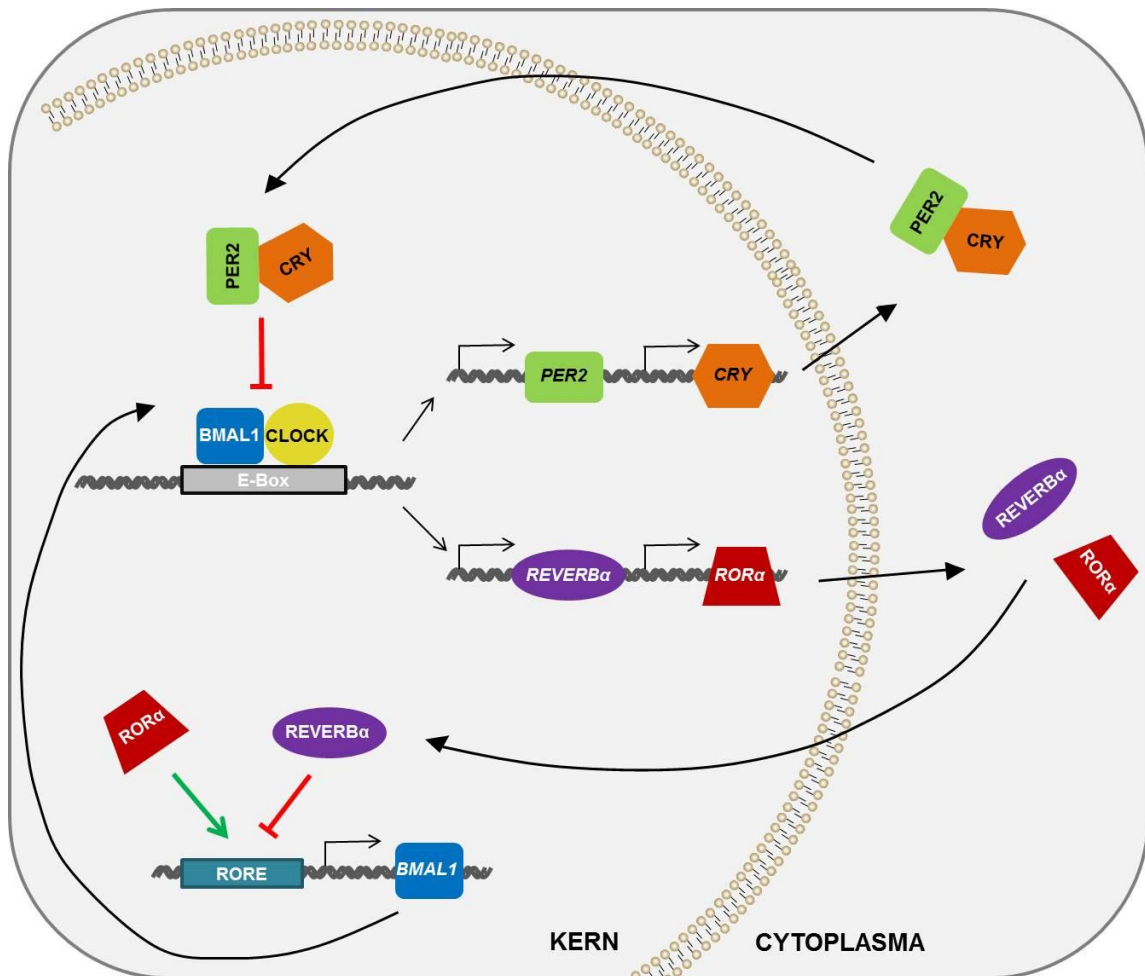
1. Circadiane Rhythmen persistieren auch unter konstanten Bedingungen; d.h. es handelt sich nicht um eine Reaktion auf vorhandene Bedingungen, sondern um eine aktive Vorbereitung darauf. Die Rhythmen bleiben z.B. auch bei konstanter Dunkelheit mit einer Periode von ungefähr 24 Stunden erhalten [4]. Erste Beobachtungen dazu wurden bereits im Jahr 1729 durch einen französischen Astronomen namens Jean Jacques d'Ortous de Mairan anhand der Blattbewegungen einer Mimose gemacht [5].
2. Der Rhythmus kann durch äußere Stimuli, sogenannte Zeitgeber, reguliert werden. Diese Phasenadjustierung wird auch als Entrainment bezeichnet. Die Photoperiode ist dabei für alle bisher untersuchten Organismen (vom Cyanobakterium bis zum Menschen) der bedeutendste Zeitgeber [1]. Weitere wichtige Zeitgeber sind v.a. die Nahrungsaufnahme und Aktivität, die den Rhythmus peripherer Organe regulieren [6].
3. Die circadiane Uhr bleibt durch nicht-rhythmische Schwankungen in der Umgebungstemperatur unbeeinflusst. Anders als die meisten chemischen und biochemischen Reaktionen, die durch erhöhte Temperaturen beschleunigt und durch niedrige Temperaturen verlangsamt werden, wirken sich selbst starke Temperaturschwankungen nicht auf die Periode der Oszillation aus, man spricht von einer Temperaturkompensiertheit [1, 7].

## 1.2 Der circadiane Rhythmus im Säugetier

### 1.2.1 Molekularer Mechanismus des circadianen Rhythmus im Säugetier

Der circadiane Rhythmus wird durch zellautonome, autoregulatorische, negative Rückkopplungsschleifen generiert, deren beteiligte Gene sich je nach Spezies unterscheiden [8, 9]. Circadiane Rückkopplungsschleifen werden erzeugt, indem die Expression von Clock-Proteinen induziert wird, die nach einer signifikanten Zeitverzögerung ihre eigene Transkription inhibieren [10]. Im Säugetier besteht der molekulare Mechanismus dabei aus drei transkriptionalen/translationalen Rückkopplungsschleifen, an denen 14 Clockgene beteiligt sind [11]. Die Hauptakteure der drei Rückkopplungsschleifen sind die Transkriptionsfaktoren BMAL1 (Brain and muscle ARNT-like 1) und CLOCK [12], PER (Period), CRY (Cryptochrom) [13], REVERB $\alpha$  und ROR $\alpha$  (RAR-related orphan receptor) [1, 14]. BMAL1 und CLOCK gehören zu der Familie der basischen Helix-Loop-Helix-PAS (*Period-Arnt-Single-Minded*)-Transkriptionsfaktoren und bilden die erste Rückkopplungsschleife. Sie induzieren, als über ihre PAS-Domänen verbundenes Heterodimer, die Expression von PER, CRY, REVERB $\alpha$  und ROR $\alpha$ , indem sie E-Box-Sequenzen der Promoter dieser Gene binden [15]. PER- und CRY-Proteine akkumulieren daraufhin, bilden einen Komplex, translozieren zeitverzögert in den Zellkern und hemmen dort als negative Rückkopplungsschleife das BMAL1:CLOCK-Heterodimer und damit ihre eigene Expression [9, 15]. Mit der Zeit wird der PER-CRY-Komplex abgebaut, so dass der Zyklus erneut beginnen kann [13]. In einer dritten Rückkopplungsschleife regulieren REVERB $\alpha$  und ROR $\alpha$ , BMAL1 durch eine kompetitive Bindung an dessen RORE-Element im Promotor [14], wobei REVERB $\alpha$  als reprimierender und ROR $\alpha$  als aktivierender Faktor wirkt (Abbildung 1) [6, 9, 10, 14, 16].





**Abbildung 1: Transkriptionale/translationale Rückkopplungsschleife im Säugetier**

Schematische Darstellung der drei transkriptionalen/translationalen Rückkopplungsschleifen der circadianen Clock-Maschinerie im Säugetier. Das Heterodimer aus BMAL1 und CLOCK induziert die Genexpression von PER2, CRY, REVERB $\alpha$  und ROR $\alpha$ . PER2 und CRY wirken inhibierend auf BMAL1/CLOCK während REVERB $\alpha$  und ROR $\alpha$  die Expression von BMAL1 regulieren.

Post-translationale Modifikationen sorgen für eine zusätzliche Stabilisierung des circadianen Rhythmus und regulieren die Zeitverzögerung, die für eine robuste 24 h-Oszillation notwendig ist [17-19]. Bei den Modifikationen handelt es sich z.B. um Phosphorylierungen, Ubiquitinierungen, Acetylierungen und Sumoylierungen der beteiligten Clockgene [18-21]. Die dabei am besten untersuchte Modifikation ist die Phosphorylierung. Unter anderem werden CLOCK, CRY, BMAL1 und PER rhythmisch phosphoryliert [8]. Eine Phosphorylierung von REVERB $\alpha$  durch GSK3 $\beta$ , einer Glykogensynthase-Kinase, führt zur Degradierung von REVERB $\alpha$ , so dass die Expression von BMAL1 erhöht wird. Dass BMAL1 ebenfalls von GSK3 $\beta$  phosphoryliert und daraufhin degradiert wird, macht das empfindliche Gleichgewicht deutlich, das zur Generierung des circadianen Rhythmus notwendig ist [8]. Neben post-translationalen Modifikationen sind Veränderungen auf epigenetischer Ebene, wie circadiane

Histonacetylierung [22] und -ubiquitinierung [23] sowie Histon- und DNA-Methylierung [24] bei der Feinjustierung des circadianen Rhythmus nachgewiesen worden [25, 26].

Der durch die 14 Kern-Clockgene generierte circadiane Rhythmus wird über cis-regulatorische Elemente, Histonmodifikationen oder nachgeschaltete Transkriptionsregulatoren, wie z.B. DBP, TEF und HLF [27] (s. 1.3.1), auf sogenannte Clock-kontrollierte Gene übertragen. Diese Zielgene der Clock-Maschinerie sind ausschlaggebend für die funktionale Umsetzung der Rhythmusinformation, ohne jedoch an der Generierung des Rhythmus beteiligt zu sein [28, 29]. Transkriptomanalysen haben gezeigt, dass bis zu 40% der Protein-kodierenden Gene in Nagern [30] und im Menschen [31, 32] gewebespezifisch, circadian exprimiert werden und somit eine Anpassung an tageszeit-abhängige Veränderungen ermöglichen.

### 1.2.1.1 Hierarchischer Aufbau des circadianen Rhythmus im Säugetier

Das circadiane System der Säugetiere ist hierarchisch aufgebaut und setzt sich aus einem zentralen Taktgeber, dem *Nukleus suprachiasmaticus* (SCN), und peripheren Oszillatoren zusammen [1]. Im Englischen wird es als *hierarchical multi-oscillator circadian system* bezeichnet; d.h. es besteht aus multiplen Oszillatoren, denen der SCN übergeordnet ist [33].

Der SCN ist eine bilaterale Gruppierung von ungefähr 20.000 Neuronen direkt über der Sehnervkreuzung (*Chiasma opticum*) im Hypothalamus, die durch äußere tagesperiodische Schwankungen synchronisiert werden. Diese Synchronisierung wird über Lichtsignale vermittelt, die von der Retina des Auges wahrgenommen und durch retinale Ganglienzellen über den retinohypothalamischen Trakt zum SCN weitergeleitet werden [34]. Die dort ankommenden elektrophysiologischen Signale werden in biochemische Signale umgewandelt, welche die SCN-Neuronen synchronisieren. Im Detail bewirken die ankommenden Aktionspotentiale eine Ausschüttung von Glutamat oder PACAP, was zu einer Öffnung der Calciumkanäle führt. Durch den Calcium-Influx werden Kinasen aktiviert, die den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element-binding protein*) phosphorylieren, der daraufhin an das CRE-Box-Element im Per1-Promotor bindet und dessen Expression induziert [1, 35, 36]. Eine enge Kopplung der Neuronen ermöglicht die parakrine und synaptische Kommunikation, welche die Persistenz des Rhythmus auch unter konstanten Bedingungen ermöglicht (s. 1.1) [1, 37]. Interessanterweise zeigen SCN Neuronen sogar *ex vivo* für bis zu 3 Wochen robuste, elektropysiologische Oszillationen [38].

Die Weiterleitung der Information an weitere Gehirnareale und periphere Organe erfolgt zum einen direkt über das autonome Nervensystem und die

Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HPA)-Achse, zum anderen werden Körpertemperatur, Blutdruck und Herzfrequenz rhythmisch beeinflusst, welche sich indirekt über den Aktivitätsstatus auf das Nahrungsverhalten auswirken [5, 39-41]. Die Nahrungsaufnahme wiederum wird als dominanter Zeitgeber peripherer Organe angesehen; dazu gehören v.a. die Leber, die Bauchspeicheldrüse, die Niere, das Herz und die Skelettmuskeln [42]. Der Tag-Nacht-Wechsel bestimmt daher nicht nur Schlaf-Wach-Phasen und die bevorzugte Zeit der Nahrungsaufnahme, sondern auch die Metabolisierung der Nahrung passt sich der inneren Uhr an [1]. Tatsächlich werden zahlreiche Gene der Leber, die für Schlüsselenzyme des Metabolismus, der Energiehomöostase, der Nahrungsverarbeitung und der Detoxifizierung kodieren, rhythmisch exprimiert [27].

Die übergeordnete Rolle des SCN (auch „Master-Clock“ genannt) wurde erstmals mit Hilfe von Läsionsexperimenten an der Ratte im Jahre 1972 entdeckt [40, 43]. Weiterführende Untersuchungen anhand von Transplantationsexperimenten an Hamstern untermauerten die Bedeutung des SCN in der Generierung und Aufrechterhaltung circadianer Rhythmen [44]. Entgegen der ursprünglichen Annahme, dass der SCN allein für den circadianen Rhythmus verantwortlich ist, wurden vermehrt Studien veröffentlicht, die auf die Existenz peripherer Oszillatoren hinwiesen [33]. So wurden z.B. circadiane Rhythmen der Respirations- und Sekretionsrate in Organkulturen der Nebenniere des Hamsters gezeigt [45]. Einige Jahre später gelang Tosini und Menaker (1996) der Nachweis eines circadianen Rhythmus der Melatonin-Synthese in neuronalen Retinazellen des Hamsters *in vitro*, der durch Lichtzyklen getriggert wurde [46]. Kurz darauf zeigten Basalobre et al. erstmalig die Clockgen-Oszillation in synchronisierten Rattenfibroblasten *in vitro* [47]. Ein weiterer entscheidender Durchbruch bei der Identifizierung peripherer Oszillatoren war der Nachweis circadianer Oszillationen in mehreren Organen und Geweben der Ratte [34]. Aktuell geht man davon aus, dass nahezu jede Zelle im Säugetier als circadianer Oszillator wirken kann und der SCN die Rhythmen der einzelnen Gewebe und Organe koordiniert [5, 1, 34, 41, 48].

### 1.2.1.2 Der circadiane Rhythmus *in vitro*

Die Untersuchung des circadianen Rhythmus *in vitro* bedingt eine Synchronisierung kultivierter Zellen, da sie ohne äußeren Stimulus desynchronisieren, so dass jede Zelle ihrem eigenen Rhythmus folgt [49-52].

Während SCN-Zellen [53] und Retinazellen [46] mittels Licht synchronisiert werden können, benötigen Licht-unsensitive Zellen andere Stimuli, die die Phasen der einzelnen Zellen zueinander abstimmen [47, 54-56]. Schibler et al. zeigten bereits im

Jahr 1998, dass immortalisierte Rattenfibroblasten selbst nach 25 Jahren in der Zellkultur noch robuste Clockgen-Rhythmen aufweisen, die mindestens drei Tage anhielten, wenn man sie zuvor durch einen Serumschock synchronisiert hatte. Dabei stellten sie fest, dass der Serumschock, also eine zweistündige Behandlung der zuvor gehungerten Fibroblasten mit 50% Pferdeserum, ähnliche Genexpressionsmuster der *Immediate early genes* (darunter *per1* und *per2*) hervorruft, wie es in SCN-Zellen durch Licht induziert wird [47]. Zwei Jahre später wurde gezeigt, dass Forskolin über die Aktivierung der Adenylatcyclase und eine dadurch hervorgerufene Erhöhung des cAMP-Levels und damit verstärkten Phosphorylierung von Creb gleichermaßen zur Synchronisierung von Rattenzellen *in vitro* verwendet werden kann. Im Vergleich zur Synchronisierung durch Serumschock konnte ebenfalls eine starke initiale Induktion von *per1* aber keine akute Induktion von *per2* festgestellt werden [56]. Eine Phosphorylierung von Creb und die circadiane Oszillation von Per1, Per2 und Dbp wurde durch beide Synchronisierungsmethoden hervorgerufen [56]. Ein initialer Anstieg der *Per1*-Expression mit anschließender robuster Clockgen-Oszillation wurde ebenso in Rattenfibroblasten festgestellt, die mit dem künstlichen Glucocorticoid Dexamethason synchronisiert wurden [55]. *In vivo* wird die circadiane Ausschüttung von Glucocorticoid-Hormonen vom SCN über die HPA-Achse vermittelt [57, 58]. Glucocorticoide wirken über Glucocorticoid-Rezeptoren (GR), die in nahezu allen peripheren Zelltypen exprimiert werden [58, 59]. Sie regulieren unter anderem die Expression von Clockgenen und sind an der Synchronisierung peripherer Uhren beteiligt [55, 57, 60]. Wegen der Ähnlichkeit zur physiologischen Situation und der ubiquitären Expression des GR hat sich die Dexamethason-Behandlung zur Zellsynchronisierung *in vitro* neben dem Serumschock als Standardmethode etabliert [47, 54, 61, 62], so dass mittlerweile Studien des circadianen Rhythmus in zahlreichen Zelllinien möglich sind [42, 63-66].

In der Folge können *in vivo*-Studien zur Erforschung des circadianen Rhythmus reduziert werden, welche mitunter eine große Anzahl von Versuchstieren benötigen. Dies ist z.B. bei der Testung der Wirkung von Substanzen auf ihren Einfluss auf die Clockgen-Expression der Fall, bei der pro Substanzkonzentration eine Kontroll- und eine Behandlungsgruppe pro Zeitpunkt benötigt wird [49]. Im Sinne des Tierschutzes ist es also erforderlich, *in vitro* Testsysteme zur Untersuchung des circadianen Rhythmus weiterzuentwickeln.

### 1.2.2 Circadiane Rhythmen in physiologischen Prozessen

Wie oben beschrieben wirkt sich der circadiane Rhythmus nicht nur auf das Verhalten von Organismen, sondern auch auf die Physiologie und den Metabolismus

aus. Mittlerweile sind unzählige Zusammenhänge des circadianen Systems mit molekularen und physiologischen Prozessen aufgedeckt worden, die dem Organismus eine optimale Anpassung an die wechselnde Umgebung ermöglichen [39]. Es handelt sich um komplexe neuronale, hormonelle und molekulare Vernetzungen, die notwendig sind, um Homöostase und Körperfunktionen aufrecht zu erhalten [67]. Eine Störung des Rhythmus kann daher starke Auswirkungen auf die Gesundheit haben [68]. Dabei werden einige potentielle Störfaktoren durch den modernen Lifestyle erzeugt. Dazu gehören unter anderem Lichtverschmutzung, Jetlag und Schichtarbeit, die allesamt das physiologische Gleichgewicht derart stören, dass sich kardiovaskuläre [69], mentale [70], metabolische [68] und Krebserkrankungen [71] entwickeln können. Das Arbeiten in Nachtschichten wurde von der internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) sogar als Kanzerogen der Gruppe 2A, also als „wahrscheinlich kanzerogen für Menschen“ eingestuft [72].

### 1.2.2.1 Das kardiovaskuläre System

Das kardiovaskuläre System zeigt eine klare Abhängigkeit vom Tageszeitpunkt [69, 73-75]. Nachdem Clockgen-Oszillationen sowohl im Herzen [76] als auch in der Aorta [77] der Maus nachgewiesen wurden, zeigten RNA-seq-Analysen, dass 6% der Protein-kodierenden murinen Gene des Herzens und 4% der Aorta circadiane Oszillationen aufweisen [30]. Zusätzlich zeigten Studien an humanen Myokardbiopsien einen circadianen Rhythmus von *PER1*-, *PER2*- und *BMAL1*-mRNAs, die antiphasisch zu denen der nachtaktiven Nager verläuft [78], also entsprechend der Schlaf-Wach-Phasen angepasst ist. Tagsüber, beziehungsweise in der aktiven Phase, werden mehr Nährstoffe und Sauerstoff benötigt als in der Ruhephase. Daher schlägt das Herz in der aktiven Phase mit einer höheren Frequenz. Damit verknüpft sind rhythmische Unterschiede des Blutdrucks und der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung in Geweben [74, 79]. Allerdings verringert sich die Fähigkeit zur Gefäßerweiterung humaner Endothelzellen in den Morgenstunden [80]. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Schlaganfall, Herzinfarkt und plötzlicher Herztod vermehrt in den Morgenstunden auftreten [69, 73, 74, 81]. Außerdem zeigen Mausstudien, dass eine Störung des circadianen Rhythmus die Funktionalität des kardiovaskulären Systems beeinflusst [82-84]. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass eine Mutation im Exon 19 des *Clock*-Gens von murinen Kardiomyocyten zu einer reduzierten Herzfrequenz und einem erhöhten Sauerstoffverbrauch führte [82]. Tatsächlich weisen epidemiologische Studien [75, 85], auf ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen bei gestörtem circadianen Rhythmus hin [74]. Eine circadiane Disruption, wie sie durch Schichtarbeit hervorgerufen wird, kann zu

Bluthochdruck und einem Ansteigen von Entzündungsmarkern im Blut führen. Daher gilt Schichtarbeit als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen [75].

### 1.2.2.2 Das endokrine System

Das endokrine System ist ein wichtiger Bestandteil bei der Aufrechterhaltung circadianer Rhythmen, da das SCN die Information des Tag-Nacht-Wechsels sowohl über neuronale als auch über hormonelle Signale weiterleitet [41]. Somit weist eine Vielzahl von Hormonen, wie z.B. Melatonin, Cortisol und Geschlechtshormone eine circadiane Oszillation auf [42, 86]. Interessanterweise leitet Melatonin im Menschen die Schlafphase ein, während es in nachtaktiven Tieren vermehrt zu Beginn der aktiven Phase ausgeschüttet wird [42]. Weiterhin wurde gezeigt, dass Melatonin u.a. in der Regulation des Blutdrucks und des Immunsystems beteiligt ist [42]. Cortisol gehört zu den Glucocorticoiden, die die Funktion nahezu aller Organe und Gewebe regulieren und ihren Peak am Ende der Schlafphase aufweisen [57, 86, 87]. Ihre Ausschüttung wird vom SCN über die HPA-Achse vermittelt; sie regulieren die Expression von Clockgenen und synchronisieren somit periphere Uhren [57]. Das künstliche Glucocorticoid Dexamethason wird zur Synchronisierung von Zellen *in vitro* verwendet (s. 1.2.1.2). Wird der hormonelle Rhythmus durch Jetlag oder Schichtarbeit gestört, versagt das funktionelle Netzwerk, das zum Erhalt der Homöostase notwendig ist. Mögliche Konsequenzen sind Schlafstörungen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und die Bildung von Tumoren [42]. Gleichmaßen kann eine Störung des hormonellen Rhythmus durch endokrine Disruptoren hervorgerufen werden und in eine Störung des circadianen Rhythmus resultieren [88]. Endokrin aktive Substanzen sind Chemikalien oder Mischungen von Chemikalien, die die natürliche biochemische Wirkweise von Hormonen stören und dadurch schädliche Effekte hervorrufen [89, 90]. So wurde zum Beispiel eine Interaktion von PER2 und dem Estrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) in der humanen Brustkrebszelllinie MCF7 nachgewiesen [91], von der gezeigt wurde, dass sie eine Störung der Clockgen-Oszillation aufweist [92, 93]. Eine Bindung von PER2 an ER $\alpha$  führte zu dessen Degradation und ein durch RNA-Interferenz reduziertes *PER2*-Level stabilisierte ER $\alpha$ . Gleichzeitig wurde die *PER2*-Expression in den Zellen durch Estrogene induziert [91]. Der Estrogen-Signalweg scheint also in direkter Wechselwirkung mit dem circadianen Rhythmus zu stehen [91]. Tatsächlich belegen einige epidemiologische Studien einen Zusammenhang zwischen hormon-abhängigen Tumoren und Schichtarbeit bzw. nächtlicher Lichtexposition [94, 95]. Dies wird vorwiegend auf eine Störung der rhythmischen Melatoninausschüttung zurückgeführt [96-98]. Allerdings sprechen andere Studien gegen die Korrelation von Schichtarbeit-bedingter circadianer Disruption und Krebsentstehung [99, 100]. Ein systematisches



Review aus dem Jahr 2018, das sich mit 33 epidemiologischen Studien zu dem Thema Brust- oder Prostatakrebs durch circadiane Disruption auseinandergesetzt hat, stellte eine Korrelation in 62,5% der Erhebungen fest [100]. Es wird vermutet, dass die Diskrepanz der Daten auf unterschiedliche Definitionen von Schichtarbeit zurückzuführen ist [100]. Die Dauer der Schichtarbeit, welche ausschlaggebend für das Krebsrisiko zu sein scheint, war in den meisten Studien nicht erfasst [97].

### 1.2.2.3 Das Immunsystem

Das Immunsystem unterliegt ebenfalls circadianen Einflüssen. Dabei wird eine Vielzahl der Komponenten des Immunsystems in ihrer Transkription direkt durch die Clockgene CLOCK, BMAL1 und REVERB $\alpha$  reguliert, während andere Komponenten indirekt durch Clock-kontrollierte Gene und regulatorische RNAs beeinflusst werden [101]. Cytokinexpression, Immunzell-Transport, und Phagozytose weisen tageszeitabhängige Muster auf [102, 103]. Des Weiteren wurden molekulare Rhythmen in natürlichen Killerzellen, B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen nachgewiesen [103-106]. Daraus resultiert eine maximale Aktivität des Immunsystems, zu Zeitpunkten, zu denen die Wahrscheinlichkeit eines Pathogenkontakts erhöht ist [101]. Gleichzeitig variiert die Suszeptibilität für Infektionen tageszeitabhängig, wie es bereits 1973 in Mausexperimenten gezeigt wurde [107] und kürzlich anhand einer Humanstudie bestätigt werden konnte. Diese zeigte eine verstärkte inflammatorische Response in gesunden Probanden, denen nachts das *E.coli* Endotoxin LPS verabreicht wurde [108]. Eine Störung des circadianen Rhythmus kann folglich zu einer veränderten Immunantwort führen, wie es in einigen Nagerstudien gezeigt wurde [109-111]. Des Weiteren konnte in einer Humanstudie gezeigt werden, dass eine circadiane Disruption in Traumapatienten mit einer erhöhten Sepsis-Inzidenz korreliert [112]. Schichtarbeit, als prominente Ursache für circadiane Disruption, wird außerdem mit immunassoziierten Erkrankungen wie kardiovaskulären Erkrankungen, Krebs und Stoffwechselerkrankungen in Verbindung gebracht [67]. Eine vollständige Erforschung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Interaktion des circadianen Rhythmus mit dem Immunsystem würde einen Durchbruch in der Immuntherapie bedeuten. Unter anderem versprechen sich Wissenschaftler\*innen daraus eine Verbesserung in der Impfeffizienz [101, 113].

### 1.2.2.4 Das metabolische System

Neben dem kardiovaskulären, dem endokrinen und dem Immunsystem befinden sich metabolische Prozesse ebenfalls in Abhängigkeit von der circadianen Uhr. Dies basiert vermutlich auf dem evolutionären Vorteil der Einsparung von Energie,

wenn anabole und katabole Prozesse, wie z.B. Gluceogenese und Glycolyse, einer zeitlichen Trennung unterliegen [114]. Versuche an Mäusen, bei denen gezielt Clockgene mutiert oder vollständig inaktiviert wurden, belegen die circadiane Abhängigkeit des Metabolismus auf Genebene. Erstmals wurde dies in *Clock*- $\Delta$ 19 mutierten Mäusen gezeigt, welche eine Mutation im Exon 19 von *Clock* aufweisen, die eine Veränderung des circadianen Nahrungsverhaltens hervorruft [115]. Mittlerweile sind zahlreiche Zusammenhänge zwischen Clockgenen und dem Rhythmus von Verhalten und Metabolismus beschrieben worden. So führen nicht nur Mutationen in *Clock* sondern auch in *Per2* zu einem veränderten Rhythmus der Nahrungsaufnahme [116, 117]. Auf physiologischer Ebene führt eine *Clock*-Mutation unter anderem zu einer Hyperphagia und Fettleibigkeit, sowie erhöhten Leptin-, Lipid- und Glucosewerten im Blut. Desweiteren wurde eine reduzierte Insulinausschüttung beobachtet [116, 118]. *Reverba* und  $-\beta$ -knockout-Mäuse weisen einen deregulierten Lipidstoffwechsel auf [119] und eine leberspezifische Deletion von *bmal1* in Mäusen resultiert in eine Hypoglykämie in der Nahrungspause, eine erhöhte Glucose-Clearance und den Verlust einer rhythmischen Expression von Glucose-regulierenden Genen der Leber [120]. Tatsächlich verursacht eine Rhythmusstörung auch im Menschen steigende Glucose- und Lipidlevel, sowie eine erhöhte Körpermasse [67]. Eine experimentelle Störung des Rhythmus wies Symptome auf, die mit dem Vorstadium einer Diabetes Typ 2 ähnelte [113, 121].

Als zentrales Bindeglied zwischen dem circadianen System und dem Metabolismus wurde Sirtuin 1 (SIRT) beschrieben [122, 123, 124]. Hierbei handelt es sich um ein Mitglied der SIRT-Deacetylase-Familie, das neben zahlreichen anderen Funktionen direkt in die Regulation der Clock-Maschinerie involviert ist. SIRT1 deacetyliert die Clockproteine BMAL1 [123] und PER2 [122, 124]. Dazu benötigt es den Cofaktor Nicotinamidadenindinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) und ist daher aktiv, wenn das  $\text{NAD}^+$ -Level (während der Hungerphase) erhöht ist. Daraus ergibt sich eine direkte Bindegliedfunktion von SIRT1 zwischen dem zellulären Metabolismus und der Clock-Maschinerie [42, 64, 123].

### 1.3 Fremdstoffmetabolismus

Neben der Umwandlung und Verwertung endogener Substanzen ist der Metabolismus von Fremdstoffen sehr wichtig [125, 126], da der Mensch einer Vielzahl sogenannter Xenobiotika ausgesetzt [127]. Dabei handelt es sich um Fremdstoffe, die (physiologisch gesehen) körperfremd sind. Dazu gehören unter anderem synthetisch hergestellte Substanzen, wie Medikamente, Konservierungsmittel, Pestizide und Umweltkontaminanten [128]. Der Fremdstoffmetabolismus (oder auch die



Biotransformation der Fremdstoffe) findet vorwiegend in der Leber statt und dient der Inaktivierung und Ausscheidung dieser Fremdstoffe, die entsprechend ihrer physikochemischen Eigenschaft über die Niere als Urin oder über die Leber und Galle als Stuhl ausgeschieden werden können [129]. Kleine, hydrophile organische Substanzen werden dabei vorwiegend über den Urin ausgeschieden, während große, amphipatische Substanzen eher über die Galle eliminiert werden [130].

Die Biotransformation lässt sich in drei Phasen unterteilen [131]. In der Phase I-Reaktion werden die lipophilen Substanzen durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse in aktive Metaboliten umgesetzt, die eine funktionelle Gruppe besitzen. Diese funktionelle Gruppe ist hochreaktiv, so dass die Toxizität des Metaboliten höher als die der Ausgangssubstanz und potentiell karzinogen sein kann [132-136]. Die Enzyme, welche die Phase I-Reaktion katalysieren, gehören hauptsächlich der Familie der mitochondrialen Cytochrom-P450-Enzyme (CYPs) an [137, 138], die 1958 das erste Mal beschrieben wurden [139]. Weiterhin sind Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenasen, Esterasen und Hydrolasen an Phase I-Reaktionen beteiligt [140]. An die entstandene funktionelle Gruppe werden in der Phase II-Reaktion polare Gruppen konjugiert, die somit die Wasserlöslichkeit des Moleküls erhöhen. Zu den Phase II-Enzymen gehören Sulfotransferasen, Glucoronyltransferasen, Glutathion-S-Transferasen und N-Acetyltransferasen [131]. Der nun meist bedeutend weniger toxische Metabolit wird in der Phase III-Reaktion hauptsächlich durch Multidrug-Resistance-Related (MDR) Proteine aus der Gruppe der ABC-Transporter aus der Zelle exportiert [141].

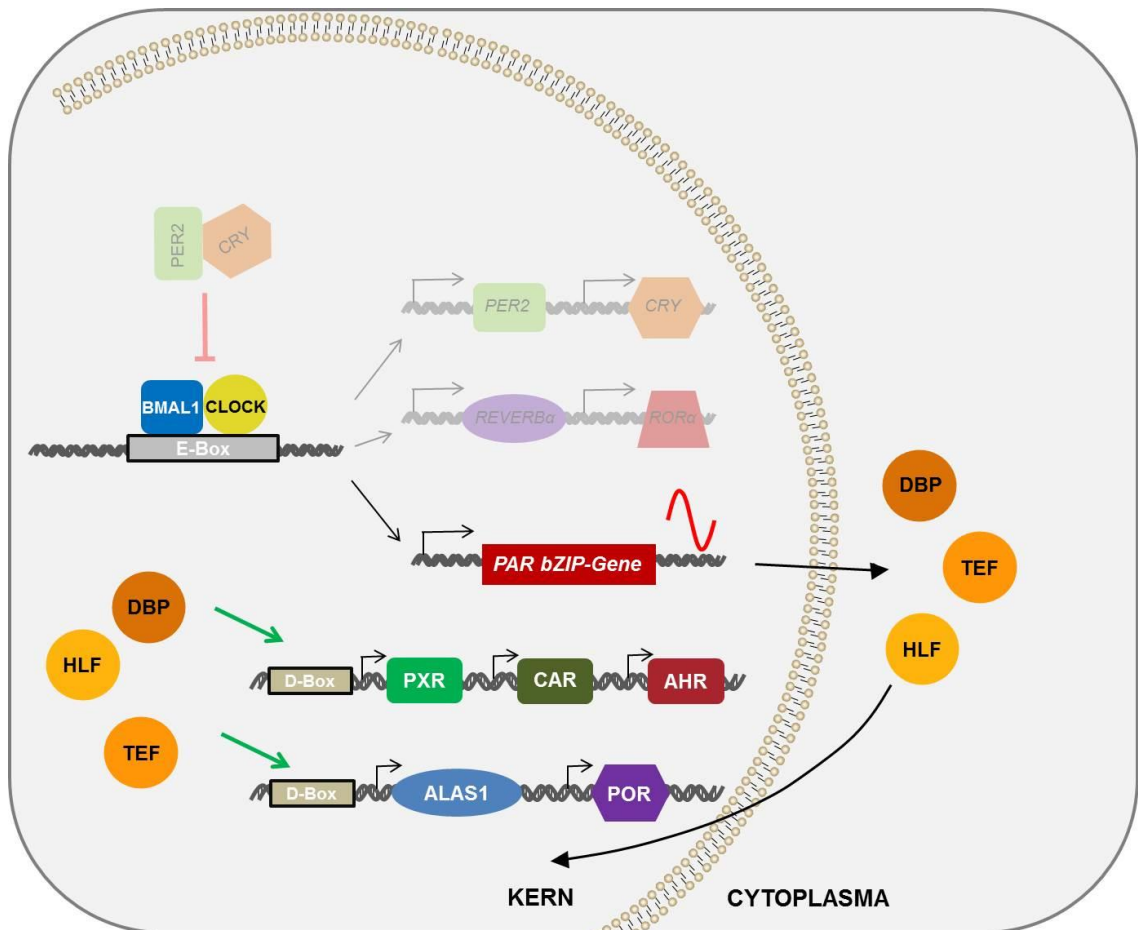
Drei Rezeptoren, die insbesondere in der Leber und im Dünndarm exprimiert werden, sind maßgeblich an der Regulation der Expression der Enzyme des Fremdstoffmetabolismus beteiligt: Der Constitutive androstane Rezeptor (CAR) [142], der Pregnan-X-Rezeptor (PXR) [143, 144] und der Arylhydrocarbonrezeptor (AHR) [145]. Alle drei Rezeptoren sind Transkriptionsfaktoren, die im inaktiven Zustand im Cytoplasma vorliegen, wo sie in Form eines Proteinkomplexes an Chaperone gebunden sind [143, 145]. Xenobiotika bewirken durch eine direkte Ligandenbindung oder im Fall von CAR auch über eine Signalkaskade [146] eine Translokation der Rezeptoren in den Kern, wo sie die Expression der Phase I, II und III Gene über *Xenobiotic response elements* (XRE) in den jeweiligen Promotoren regulieren [141, 146].

### 1.3.1 Circadiane Regulation des Fremdstoffmetabolismus

Der Fremdstoffmetabolismus wird gleichermaßen, wie andere lebenswichtige physiologische Prozesse, durch die circadiane Uhr reguliert. Tatsächlich gilt die tageszeitabhängige Entgiftung des Körpers durch die Leber als eine der

Schlüsselrollen des circadianen Rhythmus, da Schadstoffe vorwiegend (in der aktiven Phase) über die Nahrung aufgenommen werden [126]. Die Effizienz der Biotransformation von Fremdstoffen in wasserlösliche Substanzen, die vom Körper ausgeschieden werden können, wird also durch eine rhythmische Regulation maximiert. Die toxikokinetischen Vorgänge der Absorption, Distribution, des Metabolismus und der Exkretion (ADME) einer Substanz sowie die Toxikodynamik unterliegen also tageszeitabhängigen Veränderungen. Das bedeutet in der Folge, dass die Wirkung und Nebenwirkung von Medikamenten (s. 1.3.2) ebenso wie die Toxizität von Substanzen (s. 1.3.3) zeitabhängig variieren kann [125].

Die Regulation erfolgt unmittelbar über die Clock-Maschinerie, welche die Expression von *Proline and Acidic amino acid-rich Basic Leucine Zipper* (PAR bZIP) Transkriptionsfaktoren steuert. Namentlich sind dies die Clock-kontrollierten Gene DBP (*albumin D-Box binding protein*), TEF (*thyroid embryonic factor*) und HLF (*hepatic leukemia factor*). Diese wiederum binden rhythmisch D-Box-enhaltende Promotoren und wirken somit als Transkriptionsfaktoren auf die Expression der drei oben genannten Fremdstoffmetabolismus-Rezeptoren CAR, PXR und AHR (s. 1.3). Zusätzlich werden P450 Oxidoreduktasen (POR) und die Aminolävulinatsynthase (ALAS1) über die PAR bZip-Proteine reguliert, welche für die Funktionalität der P450-Enzyme essentiell sind (Abbildung 2). POR überträgt die für die Monooxygenase-Reaktion benötigten Elektronen, während ALAS1 als limitierender Faktor an der Synthese der Hämgruppe der P450 Monooxygenasen beteiligt ist. Transkriptomanalysen mittels Microarray-Technologien haben zahlreiche weitere Zielgene von PAR bZip-Proteinen aufgedeckt, die in der Leber und Niere am Fremdstoffmetabolismus beteiligt sind [21, 27]. Dies wurde anhand von Knockout-Mäusen untersucht, bei denen alle drei PAR bZip-Gene abgeschaltet wurden. Während diese Mäuse hochempfindlich auf Xenobiotika reagieren und Anzeichen von verfrühter Alterung aufweisen, ist keine Veränderung des rhythmischen Verhaltens oder der Clockgenexpression erkennbar. Das heißt, dass DBP, TEF und HLF an der Regulation der Fremdstoffrezeptoren beteiligt sind, ohne die Clock-Maschinerie zu beeinflussen [147].



**Abbildung 2: Circadiane Regulation des Fremdstoffmetabolismus**

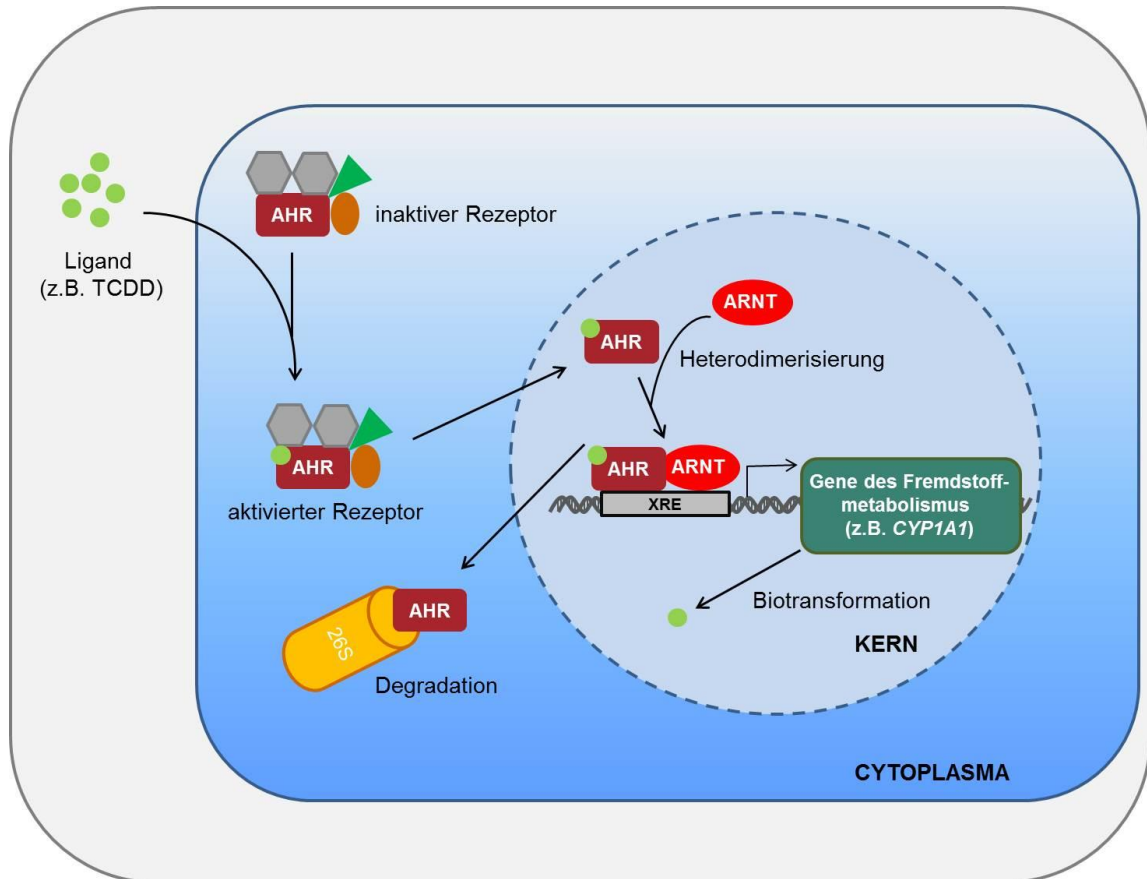
Schematische Darstellung der circadianen Regulation des Fremdstoffmetabolismus im Säugetier. Die Clock-Maschinerie induziert die Expression der PAR bZIP-Transkriptionsfaktoren DBP, TEF und HLF, welche die Expression der Fremdstoffmetabolismus-Rezeptoren PXR, CAR und AHR, sowie die für die Aktivität der P450 Cytochrome essentiellen Gene ALAS1 und POR regulieren.

### 1.3.1.1 Arylhydrocarbonrezeptor

Der am meisten untersuchte Fremdstoffmetabolismus-Rezeptor im Säugetier ist der AHR [148] (s. 1.3). Er gehört zu der Familie der basischen Helix-loop-helix-Period/ARNT/Single minded (bHLH-PAS) Transkriptionsfaktoren [149]. Es handelt sich dabei um ein hochkonserviertes Protein, das bereits vor 450 Millionen Jahren, also weit vor der Industrialisierung, in Vertebraten exprimiert wurde [150, 151]. AHR-Homologe in Invertebraten zeigen keine Responsivität auf Umweltkontaminanten wie Dioxine [152], die als typische Liganden des AHR von Vertebraten gelten. Die Funktion des Fremdstoffmetabolismus-Rezeptors scheint sich demnach als Adaptation in Vertebraten entwickelt zu haben. Erste Hinweise zu einer AHR-regulierten Cyp1a1-Expression wurden in Knochenfischen gefunden, die sich vor ungefähr 400 Millionen Jahren von der Abstammungslinie der Menschen abgespalten haben [150, 153]. Des

Weiteren wurden endogene Liganden des AHR identifiziert [151]. Das alles weist darauf hin, dass der AHR weitaus umfassendere Funktionen als die Regulation des Fremdstoffmetabolismus hat [148, 150, 154]. Tatsächlich weiß man aus Knockout-Versuchen in Mäusen, dass der AHR essentiell für zahlreiche physiologische Prozesse ist. So wirkt sich ein AHR-Knockout in der Maus negativ auf das Wachstum, das Immunsystem, das Herz-Kreislaufsystem, die Leber und andere Organe aus, während toxische Effekte durch Dioxine ausbleiben [155-159].

Als Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor liegt der AHR in inaktiver Form vorwiegend als Proteinkomplex im Cytoplasma vor [132, 148, 149, 154]. Der AHR der Vertebraten bindet eine große Anzahl chemischer Strukturen, dazu gehören Umweltkontaminanten, wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (z.B. Benzo(a)pyren) und polyhalogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (z.B. Dioxine wie TCDD) sowie Bestandteile von Pflanzenschutzmitteln (z.B. das Imidazol Prochloraz) und natürlich vorkommende Substanzen in Nahrungsmitteln wie das Indolderivat Indirubin, Carotenoide und Flavonoide sowie das bakterielle Metabolit 1,4-DHNA. Der Tryptophanmetabolit Kynurenin wurde als endogener Ligand des humanen AHR identifiziert [151, 160-164]. Eine Ligandenbindung über die PAS-B-Region bewirkt die Dissoziation vom Komplex, sowie eine Translokation in den Zellkern, wo der AHR über die PAS-A-Region mit seinem Bindungspartner Arylhydrocarbon-Nuklearrezeptor (ARNT) heterodimerisiert. Gemeinsam binden sie sogenannte *Xenobiotic response elements* (XRE) in Promotoren von Genen des Fremdstoffmetabolismus und induzieren entsprechend deren Expression [165]. Nach der Bindung wird der AHR durch sein Kernexportsignal aus dem Nukleus exportiert, wo er von dem 26S Proteasom degradiert wird [166]. Ein vielfach verwendeter Biomarker für die Aktivität des AHR ist das Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) [133, 148, 149, 154, 167] (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Signalweg des Arylhydrocarbonrezeptors**

Schematische Darstellung des AHR-Signalwegs. Eine Ligandenbindung aktiviert den im Cytosol vorliegenden Rezeptor, so dass er seinen cytoplasmatischen Komplex verlässt und in den Kern transloziert. Dort bildet der AHR ein Heterodimer mit ARNT, das an XRE-Elemente in Promotoren von Genen bindet, die am Fremdstoffmetabolismus beteiligt sind. Anschließend wird der AHR aus dem Kern exportiert und degradiert.

Interessanterweise gehören ARNT und der AHR ebenso wie CLOCK, BMAL und PER zur Familie der bHLH-PAS-Proteine, welche sich dadurch auszeichnen, sowohl mit verschiedenen Liganden als auch mit verschiedenen PAS-Domäne-aufweisenden Bindungspartnern interagieren zu können [168-170]. Noch dazu besitzt ARNT eine starke Strukturhomologie zu BMAL1 [132, 169, 170]. Das lässt den Schluss zu, dass der AHR-Signalweg mit dem circadianen Rhythmus interferieren könnte. Tatsächlich zeigten Tisckkau et al. und Xu et al. eine Interaktion des Ahr mit Bmal1 in murinen Leber- und Ovarzellen. Die Ergebnisse beider Forschungsarbeiten belegen, dass eine Aktivierung des AHR die rhythmische Genexpression von *PER1* inhibiert [171, 172]. Der AHR scheint also in der Lage zu sein, den circadianen Rhythmus zu regulieren. Andersherum folgt die Protein- und Genexpression des Ahr und seines Zielgens *Cyp1a1* dem circadianen Rhythmus, wie in einigen Studien an Nagern gezeigt werden konnte [173-175]. Zum Beispiel wurden circadiane Oszillationen der Ahr-Proteinexpression in Leber [174, 175], Lunge und Thymus der Ratte nachgewiesen

[175]. Ebenso wurde gezeigt, dass die Aktivität von Cyp1a1 in Leber, Lunge und Darm von Kaninchen sowie in Leber und Darm der Ratte tageszeitabhängig variiert [176].

Die AHR-vermittelte *Cyp1a1*-Expression dient in dieser Arbeit als *Proof of Concept*, dass die Berücksichtigung des circadianen Rhythmus in *in vitro* Testsystemen wesentlich für die Beurteilung der Toxizität von Substanzen ist.

### 1.3.2 Chronopharmakologie

Die Chronopharmakologie befasst sich mit den tageszeitabhängigen Einflüssen auf die Pharmakokinetik (ADME) und Pharmakodynamik einer Substanz [125]. Das bedeutet, dass die Wirksamkeit eines Medikaments und seine Nebenwirkungen je nach Einnahmezeitpunkt stark variieren können. Diese Abhängigkeit der Pharmakologie eines Medikaments vom circadianen Rhythmus wird in der Chronopharmakologie erforscht. Chronopharmakologische Effekte sind dabei vor allem für Krebsmedikamente, wie Zytostatika, Interferone, Antiangiogenetika und Chemotherapeutika beschrieben [177-181]. Slat et al. (2017) konnten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachweisen, dass der Zeitpunkt einer Glioblastoma-Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid die Sensitivität des Tumors beeinflusste [177]. Die maximale Wirksamkeit des Medikaments korrelierte dabei mit der maximalen *Bmal1*-Expression, eine Deletion von *Bmal1* und die damit verbundene circadiane Disruption hoben den Effekt auf [177].

Faktisch variiert die Verträglichkeit und die Effizienz einer Krebsmedikation um einen Faktor von 2-10, je nachdem zu welchem Zeitpunkt das Präparat verabreicht wurde [179]. Ebenfalls variieren die Wundheilung, die Antikörperantwort nach einer Impfung (s. 1.2.2.3) und die Überlebensrate nach einer Herzoperation (s. 1.2.2.1) [32]. Trotzdem mangelt es bislang an umfassenden chronopharmakologischen Studien. Die Hälfte der bestverkauften Medikamente weltweit wirken bekanntermaßen auf Clock-kontrollierte Gene, ohne dass der Einnahmezeitpunkt entsprechend eruiert wurde [30].

Erschwerend kommt hinzu, dass es inter-individuelle Unterschiede der internen Uhren der Patienten gibt. Man spricht von unterschiedlichen Chronotypen, die auf der Diversität von Umweltfaktoren und Genetik oder auch Geschlecht und Alter basieren können [182]. Optimalerweise sollten Therapien daher individuell auf den jeweiligen Chronotyp eingestellt werden [64]. Bislang ist dies jedoch mit einem relativ großen Aufwand verbunden, denn der aktuelle Goldstandard verlangt eine Bestimmung des Melatoninlevels im Speichel oder Plasma anhand von Probenentnahmen unter Schwachlichtbedingungen, die in einem Zeitraum von 5-6 h alle 30-60 Minuten durchgeführt werden müssen [32, 183]. Es existieren bereits verschiedene auf maschinellem Lernen basierende Algorithmen, welche die Vorhersage der circadianen



Phasen anhand der Proben ermöglichen [31, 184]. Das aktuelle Bestreben geht daher derzeit zu einer Reduzierung der notwendigen Probenanzahl. Beispielsweise wurde erst kürzlich eine diagnostische Methode entwickelt, die anhand einer einzigen Blutprobe und mit Hilfe eines Algorithmus namens *ZeitZeiger* die Bestimmung des internen Rhythmus ermöglicht [32, 185].

Neben der Erkenntnis, dass eine Berücksichtigung des Rhythmus bei der Einnahme von Medikamenten von großem Vorteil sein kann, entwickelt sich zunehmendes Interesse an der direkten Regulation der Clockgene via sogenannter *Clock targeting drugs*. Diese sollen als künstlicher Zeitgeber eingesetzt werden, um circadiane Dysregulation zu behandeln, die z.B. durch Jetlag, Schichtarbeit oder ein fortgeschrittenes Alter vorliegen kann [2, 186, 187]. Des Weiteren weisen Tumorzellen häufig eine Störung des internen Rhythmus auf, was mit einer negativen Prognose korreliert [21, 188]. Umfassende *Omics*-Analysen von 32 unterschiedlichen Krebsarten führten zu der Hypothese, dass manche Clockgene dabei als Onkogene wirken (z.B. *REVERB $\alpha$* ) und andere als Tumorsuppressoren (*PER*, *CRY*, *ROR $\alpha$* ). Eine transkriptionelle Dysregulation der Clock-Maschinerie konnte mit der Überlebensrate und dem Tumorstadium assoziiert werden [188]. Außerdem zeigten tierexperimentelle Studien eine Reduktion des Tumorwachstums *in vivo* und *in vitro* durch eine pharmakologische Wiederherstellung des Rhythmus [189-191]. Daher und wegen Therapieerfolgen in weiteren circadian-vermittelten Störungen, wie neuro-psychiatrischen Erkrankungen [192, 193], steht die Entwicklung von *Clock targeting drugs* im aktuellen Interesse der klinischen Forschung [181, 188, 194].

### 1.3.3 Chronotoxikologie

Entgegen den Erkenntnissen und Fortschritten, die im Bereich der Chronopharmakologie und -therapie erzielt wurden bzw. aktueller Bestandteil der Forschung sind (s. 1.3.2), wird der circadiane Rhythmus bislang nur wenig in toxikologischen Studien – wie vor allem in der regulatorischen Testung von Industriechemikalien, Bioziden und Pestiziden – berücksichtigt.

Anders als der Fachbereich der Toxikologie, welcher der Pharmakologie zugeordnet ist und vorwiegend der Entwicklung von Medikamenten dient, befasst sich die regulatorische Toxikologie mit der Erhebung, Bearbeitung und Evaluation von epidemiologischen und experimentellen Daten, um Mensch und Tier vor potentiell gesundheitsschädlichen Substanzen zu schützen [195]. Dabei strebt die regulatorische Toxikologie die Entwicklung von harmonisierten Standardprotokollen und neuen Testsystemen an, um die Risikobewertung von potentiell toxischen Substanzen wissenschaftlich fundiert durchführen zu können [195]. In dem Zusammenhang sind

die Prüfrichtlinien der OECD (Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung) entwickelt worden, die der Standardisierung der Chemikaliertestung dienen [196, 197]. Diese enthalten allerdings (wenn überhaupt) nur geringfügige Vorgaben zum Behandlungszeitpunkt oder dem Zeitpunkt der Probenentnahme, obwohl diese ebenso wie der Einnahmezeitpunkt von Medikamenten (1.3.2) ausschlaggebend für die Wirkung sein können [125]. Der Begriff der Chronotoxikologie, d.h. des Studiums der Interaktion des circadianen Rhythmus und der Toxikologie, wird bislang wenig verwendet und fließt entsprechend auch nicht in die Toxizitätsbewertung ein [198].

### 1.3.3.1 Chronotoxikologie *in vivo*

Neben den bereits beschriebenen zeitabhängigen Unterschieden der Verträglichkeit von Medikamenten (s. 1.3.2), gibt es auch etliche Hinweise auf essentielle rhythmische Unterschiede in der Reaktion von Organismen auf andere, toxikologisch relevante Xenobiotika [21, 199-202]. Zum Beispiel wurden Experimente durchgeführt, bei denen Mäusen über drei Wochen lang zu unterschiedlichen Zeitpunkten das Dioxin 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin (TCDD) verabreicht wurde. TCDD gehört zu den halogenierten aromatischen Hydrocarbonen und wirkt als potenter Agonist des AHR (s. 1.3.1.1). Es ist ein hochtoxisches Abfallprodukt bei Verbrennungsprozessen, bei der Chlorbleiche und der Produktion von Pestiziden und Herbiziden [171]. Seine lipophilen Eigenschaften und eine hohe Stabilität führen zu einer Akkumulation in der Umwelt und seine lange Halbwertszeit von bis zu 10 Jahren im menschlichen Körper [203] machen das Dioxin besonders relevant, wenn es um den Schutz der Gesundheit geht [173]. Die Mausexperimente zeigten nun, dass TCDD die Insulinsensitivität der Mäuse während der aktiven Phase verringerte, während sie in der inaktiven Phase unverändert blieb [199]. In einem anderen Experiment wurde die Chronotoxizität des Schwermetalls Cadmium, einer ebenfalls hochtoxischen Substanz, die in der metallverarbeitenden Industrie inhalativ aufgenommen werden kann [204], beschrieben. Hier zeigte sich eine Zeitabhängigkeit in der Lebertoxizität von Cadmium. Eine einmalige Cadmiuminjektion in der aktiven Phase wurde toleriert, eine Injektion während der inaktiven Phase zeigte dagegen eine deutliche Pathologie der Mausleber [201] bis hin zum Versterben der Tiere bei einer Injektion in der frühen inaktiven Phase [205]. Tatsächlich wurde eine derartige Tageszeitpunkt-abhängige, akute Toxizität mittels Lithiumchlorid bereits 1978 veröffentlicht. Die höchste Letalität trat hier bei einer Injektion in der Mitte der inaktiven Phase auf [200]. Es zeigt sich also, dass sich keine allgemeine Aussage über den optimalen Expositionszeitpunkt treffen lässt. Ebenso wenig lässt sich die Chronotoxizität einer Substanzklasse zuordnen. Dies wurde



kürzlich von Yoshioka et al. (2018) gezeigt. Sie untersuchten die Chronotoxizität von sieben unterschiedlichen Schwermetallen und fanden heraus, dass jede Substanz ihr individuelles circadianes Toxizitätsprofil aufwies. Während sich die Injektion von Chrom in der frühen, mittleren und späten aktiven Phase lethal auf Mäuse auswirkte, überlebte die Hälfte der Mäuse bei einer Injektion in der frühen inaktiven Phase. Eine Behandlung mit Nickel hingegen, führte vermehrt in der inaktiven Phase zum Versterben der Tiere [206].

Der erste dokumentierte Nachweis von Chronotoxizität im Menschen wurde 2012 erzielt, als 14.840 Menschen nach einer Selbstvergiftung ins Krankenhaus eingewiesen wurden. Patient\*innen, die morgens Samen des Schellenbaums (*Cascabela thevetia*) eingenommen hatten, wiesen eine 50% höhere Wahrscheinlichkeit für einen tödlichen Verlauf auf, als solche, die sie abends eingenommen hatten. Dies wurde auf eine reduzierte Absorption in den Abendstunden zurückgeführt [207]. In einer Cross-over-Studie an männlichen Testpersonen, denen das *E. coli* Endotoxin LPS injiziert wurde, konnte eine zeitliche Anhängigkeit in der akuten Immunantwort nachgewiesen werden. Die Entzündungsreaktion war nachts ausgeprägter, während oxidative Schäden tagsüber deutlicher waren [108]. Eine CYP-vermittelte circadiane Abhängigkeit konnte erstmals durch Gängler et al. (2018) bewiesen werden. Sie zeigten eine zeitliche Abhängigkeit von Harnbiomarkern und deren toxischer Effekte nach einer Exposition mit Desinfektionsmitteln [208].

Tierversuche und Humanstudien zeigen also, dass Chronotoxikologie für die Gesundheit von Mensch und Tier relevant ist und daher bei der Risikobewertung von Substanzen berücksichtigt werden sollte.

### 1.3.3.2 Chronotoxikologie *in vitro*

Seit den 90ern wurde die Untersuchung des circadianen Rhythmus mit Hilfe von Zellmodellen *in vitro* vorangetrieben. Mittlerweile werden zahlreiche Zelllinien, darunter unter anderem murine und humane Fibroblasten und Krebszellen, sowie Primärkulturen aus Blutmonozyten und Haarfollikeln verwendet [64]. Chronotoxikologie *in vitro* wurde interessanterweise bereits 1988 beschrieben, als pharmakologische Studien mit Antikrebsmedikamenten an murinen Knochenmarkzellen durchgeführt wurden. Die Chronotoxizität der verwendeten Substanzen spiegelte die zuvor erzielten *in vivo*-Ergebnisse wieder und gab somit erste Hinweise für einen Einfluss des Zellrhythmus auf die Toxizität von Medikamenten (s. 1.3.2) [202]. Gleichmaßen wurde eine Korrelation der BMAL1- Expression und der Zytotoxizität des Zytostatikums Irinotecan auf die Darmkrebs-Zelllinie Caco2 nachgewiesen [209]. Einige Zeit später wurde gezeigt, dass sich Ionisationsstrahlung (dosis- und zeitabhängig) auf die

circadiane Phase von Rattenfibroblasten auswirkt. Daraus wurde die Hypothese entwickelt, dass DNA-Schäden allgemein in der Lage sind, die circadiane Uhr zu beeinflussen [210]. Weitere Untersuchungen bestätigten eine Phasenverschiebung durch ultraviolettes Licht und oxidativen Stress, die antiphasisch zu einer Zellsynchronisierung mittels Serumschock, Forskolin oder Dexamethason verlief. Dabei war das Expressionslevel der Clockgene an sich nicht verändert. Die Tatsache, dass DNA-Schäden zu einer Zellsynchronisierung führen können, erweist sich nun als möglicher Störfaktor bei *in vitro* Tests zur Gefährdungsbeurteilung von potentiell genotoxischen Substanzen. Durch die ungewollte Synchronisierung können falsch positive Biomarker erzeugt werden, bei denen es sich *de facto* um Clock-kontrollierte Gene handelt. Deswegen schlagen Destici et al. (2009) kontrollierte Versuchsbedingungen vor, die eine Zellsynchronisierung vor Behandlungsbeginn, sowie eine Exposition zu unterschiedlichen Zeitpunkten beinhalten [211].

Neben der Untersuchung des circadianen Rhythmus, sind *in vitro* Testsysteme zunehmend in der regulatorischen Toxikologie von Bedeutung [196]. Nicht nur, dass sie im Sinne des 3R-Prinzips zur Vermeidung von Tierversuchen und zur Reduzierung der Tierzahl und des Tierleidens, sondern auch zur Ermittlung von human-spezifischer Toxizität beitragen [196, 212]. Daher gibt es ein ständiges Bestreben *in vitro* Testmethoden zu optimieren, um ihre Vorhersagekraft für die *in vivo* Situation zu verbessern [196, 212, 213].

### 1.4 Fragestellung/ Zielsetzung

Basierend auf dem Wissen, dass der circadiane Rhythmus multiple physiologische Prozesse beeinflusst und im Bestreben *in vivo* Versuche durch möglichst aussagekräftige *in vitro* Testsysteme zu ersetzen, wurde die Hypothese formuliert, dass der circadiane Rhythmus in toxikologische *in vitro* Testmethoden implementiert werden sollte, um die biologische Relevanz und Aussagekraft des Testsystems zu verbessern.

*In vivo* werden intakte Gewebe oder Organe, die einem einheitlichen circadianen Rhythmus folgen, einer Substanz ausgesetzt und reagieren somit synchron. Im Gegensatz dazu, folgt jede Zelle eines *in vitro* Versuchs ihrem eigenen Rhythmus, da ein äußerer Stimulus zur Synchronisierung fehlt. Das Entrainment der kultivierten Zellen soll nun die Response des Testsystems verbessern, so dass die *in vivo* Situation realistischer wiedergegeben wird.

In der vorliegenden Arbeit galt es also ein geeignetes *in vitro* Testsystem zu etablieren, das einen synchronisierbaren, circadianen Rhythmus und eine toxikologisch relevante Response nach Substanzbehandlung abbildet.

Anhand dieses Testsystems sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- 1) Beeinflusst eine Zellsynchronisierung die Response im Vergleich zu konventionellen *in vitro* Analysen und ermöglicht sie eine erhöhte Aussagekraft des Testergebnisses?
- 2) Kann das Testsystem eine Zeitpunkt- oder Dosisabhängigkeit nachstellen und ermöglicht damit eine Optimierung des Behandlungszeitpunkts bei biologisch relevanten Substanzkonzentrationen?

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Allgemeines Equipment

##### 2.1.1.1 Geräte

**Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte**

Gerätetyp	Gerätename	Hersteller
Blotkammer	Mini-Protean 3 cell	Bio-Rad
Blot-System	Trans-Blot SD Semi-Dry transfer	Bio-Rad
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus BBD 6220 CO2 incubator	ThermoFisher scientific
Dokumentations-System (UV+ Chemilumineszenz)	Fusion Solo S	Vilber
Elektronische Pipette	Xplorer plus electronic multi-channel pipette	Eppendorf
Elektronische Pipette	Xplorer plus electronic single channel pipette	Eppendorf
Elektroporationsgerät	GenePulser Xcell™	Bio-Rad
Fluoreszenzmikroskop	ZOE™ Fluorescent Cell Imager	Bio Rad
Heizblock	Thermostat 5320	Eppendorf
Kühlblock	BL°CKICE	Techne
Luminometer	Veritas™ Microplate Luminometer	Promega
Mikroplatteninkubator	Thermostar	BMG Labtech
Mikroskop	CKX41 inverted microscope	Olympus life science
Netzgerät	PowerPac200	Bio-Rad
Pipettierhilfe	Accu-jet pro pipette controller	BrandTech scientific
Plattenlesegerät	GENios	Tecan
Plattenlesegerät	Synergy neo2, Multi-mode Reader	Biotek
Real-Time PCR System	QuantStudio 7 Flex	Applied Biosystems
Rollmischer	Roller mixer SRT6	Stuart
Sicherheitswerkbank	Herasafe™ KSP 12	Thermo Fisher Scientific
Spectrophotometer	Nanodrop 2000 spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Thermocycler	Mastercycler nexus gradient	Eppendorf
Vakuumpumpe	EcoVac vacuum pump	schuett-biotec
Zellzähler	Countess II FL Automated Cell Counter	Invitrogen
Zentrifuge	Heraeus Labofuge 400	ThermoFisher scientific

Gerätetyp	Gerätename	Hersteller
Zentrifuge	Centrifuge 5430 R	Eppendorf

### 2.1.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Liste der Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Amersham <sup>TM</sup> Hybond Nitrocellulose-Membran	GE Healthcare	10600004
Elektroporationsküvetten	Peqlab	71-2030
Whatman Filterpapier	GE Healthcare	3030-861
Mikroplatten (schwarz, weiße Wells)	PerkinElmer	6005060
Mikroplatten (weiß)	Greiner	655098
PCR-Folie	Thermo Fisher Scientific	201807084
PCR-Strips	VWR	93001-118
Pipettenspitzen	Eppendorf	0030073460 (50-1000 $\mu$ l) 0030073428 (2-200 $\mu$ l) 0030073363 (0,1-10 $\mu$ l)
qPCR-Platten (384-Well)	Thermo Fisher Scientific	10505035
Reaktionsgefäße	Eppendorf	30121708 (0,5 ml) 0030120086 (1,5 ml) 30120094 (2 ml) 30119401 (5 ml)
Serologische Pipetten	neolab	7-4029 (5 ml) 7-4034 (10 ml) 4-0134 (25 ml) 4-0135 (50 ml)
Well-Platten	TPP	92406 (6-Well) 92412 (12-Well) 92696(96-Well)
Zellkulturschalen	TPP	93060 (53 mm) 90076 (87 mm) 90301 (137 mm)
Zentrifugenröhrchen	Falcon	352095 (15 ml) 352070 (50 ml)

## 2.1.2 Substanzen und Lösungen

### 2.1.2.1 Chemikalien und Reagenzien

Als Lösemittel der in pulvriger Form vorliegenden Substanzen wurde größtenteils DMSO verwendet. Ausgenommen davon sind 17 $\beta$ -Estradiol und ICI-182,780 welche in Ethanol gelöst wurden.

**Tabelle 3: Liste der eingesetzten Chemikalien und Reagenzien**

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
1,4-Dihydroxy-2-Naphthionsäure	Sigma-Aldrich	SA281255
17 $\beta$ -Estradiol	Sigma-Aldrich	E8875
2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin	LGC Standards	CIL-ED-901-B
30% Acrylamide:Bisacrylamide 37.5:1	Biorad	161-0158
4 x Laemmli-Puffer	Biorad	1610747
50x TAE-Puffer	Thermo Fisher Scientific	B49
Actinomycin D	Merck	114666
Ammoniumperoxidisulfate	Roth	9592.3
Benzo[a]pyren	Sigma-Aldrich	B1760
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	4693124001
Dexamethason	Sigma-Aldrich	D2915
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich	D2650
D-Luciferin	PJK	102111
Ethylendiamintetraessigsäure	Roth	X986.1
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure	Roth	3054.1
Forskolin	Sigma-Aldrich	F6886
Glycin	Sigma	G8898
ICI-182,780	Sigma-Aldrich	I4409
Igepal CA630	Sigma	I8896
Kaempferol	Sigma-Aldrich	K0133
Leptomycin B	Sigma-Aldrich	L2913
Methanol	Merck	1.060.092.511
Milchpulver	Roth	T145.3
Natrumchlorid	Roth	3957.1
PageRuler™ Plus prestained Protein ladder	Thermo Fisher Scientific	26619
Pferdeserum	Thermo Fisher Scientific	11510516
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems	15310939
Sodiumdodecylsulfat	Biorad	161-0301
SR8278	Tocris	S9576
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	M7154

## Material & Methoden

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
β-Naphthoflavon	Sigma-Aldrich	N3633
SuperSignal West Femto Chemiluminescent substrate	Thermo Fisher Scientific	34095
Tetramethylethylenediamine	SERVA	35930
Tris	Roth	5429.2
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich	T8787
Tween-20	Roth	9127.1
6x DNA-Ladepuffer	Thermo Fisher Scientific	R0611
Agarose, universal	VWR	732-2789
Gel Green Nucleic Acid Stain	Biotium	41005
1 kb DNA Ladder	New England Biolabs	N3232S

### 2.1.2.2 Puffer und Lösungen

**Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen**

Bezeichnung	Zusammensetzung	
10% SDS-Polyacrylamid-Trenngel (15ml)	5 ml	30% Acrylamide/ Bisacrylamide 37.5:1
	3,8 ml	Tris (1.5 M, pH 8.8)
	150 µl	10% SDS
	150 µl	10% APS
	6 µl	TEMED
10x PAGE-Puffer (pH 8.3)	4802,5 mM	Glycin
	625 mM	Tris add A.bidest.
10x TBS-Puffer	1,5 M	NaCl
	0,2 M	Tris add A. bidest.
1x Protein-Transferpuffer (250 ml)	50 ml	Methanol
	25 ml	10x PAGE-Puffer add A. bidest.
1x SDS-Laufpuffer (1000 ml)	10 ml	10% SDS
	100 ml	10x PAGE-Puffer add A. bidest.
5%-SDS-Polyacrylamid-Sammelgel (5 ml)	830 µl	30% Acrylamide/ Bisacrylamide 37.5:1
	630 µl	Tris (0.5 M, pH 6.8 stock)
	50 µl	10% SDS
	50 µl	10% APS
	5 µl	TEMED
Boehringer Lysepuffer	3,4 ml	A.bidest.
	50 mM	Tris/HCl pH 7.4
	150 mM	NaCl
	0,1% (w/v)	Na-deoxycholate
	0,1% (w/v)	SDS
	1% (w/v)	Igepal CA630
5 mM	EDTA, pH 8.0	
5 mM	EGTA	

## Material & Methoden

Bezeichnung	Zusammensetzung	
		add A. bidest.
TBST-Puffer (1000 ml)	1 ml 100 ml	Tween-20 10x TBS add A. bidest.
Tris/EDTA Puffer	40 mM 27 mM	Tris EDTA mit HCl auf pH 9.0 einstellen add A. bidest.

### 2.1.3 Zellkultur

#### 2.1.3.1 Zelllinien

**Tabelle 5: Liste der verwendeten Zelllinien**

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle
Caco2	Humane Kolonkarzinomzellen	ATCC [HTB-37™]
HCT116	Humane Kolonkarzinomzellen	[214]
HME1	Humane Brustepithelzellen (hTERT-immortalisiert)	ATCC, [CRL-4010™]
M13SV1	Humane Brustepithelzellen (SV40-immortalisiert)	[215]
MCF7/ vBos	Humane Brustkrebszellen	[216]

#### 2.1.3.2 Zellkulturreagenzien

**Tabelle 6: Liste der Zellkulturreagenzien**

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
BioFreeze	Biochrom/Merk	F2270
Clonetics® Trypsin Neutralizing Solution	Lonza	CC-5002
Clonetics® Trypsin/ EDTA	Lonza	CC-5012
DMEM, High Glucose (4,5 g/L Glucose)	PAN Biotech	P04-03588
DMEM, Low Glucose (1 g/L Glucose)	Gibco	11880-028
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	PAN biotech	P04-36500
Fetal bovine serum	Biochrom/Merk	S0613
Hepes (1M)	Gibco	11560496
Opti-MEM	Gibco	5198503



Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
MEBM™	Lonza	CC-3153
MEGM™ Single Quot Kit Suppl.&Growth Factors	Lonza	CC-4136
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom/Merk	A2212
Trypsin/ EDTA-Solution (0.05 %/ 0.02 %)	Biochrom/Merk	L2143

### 2.1.3.3 Zellkulturmedien

Alle verwendeten Zellkulturmedien waren frei von Phenolrot, um eine Störung der Lumineszenz-Signale der Reporterzelllinien zu vermeiden [217].

**Tabelle 7: Liste der Zellkulturmedien**

Bezeichnung	Zusammensetzung
HME1-Vollmedium	MEBM MEGM-Single Quot Kit 25 mM Hepes 1% Penicillin/ Streptomycin
HME1-Hungermedium	MEBM - 25 mM Hepes 1% Penicillin/ Streptomycin
M13SV1-Vollmedium	MSU-1-Medium 1% Penicillin/ Streptomycin 10% FBS
HCT116-Vollmedium	DMEM, High Glucose 1% Penicillin/ Streptomycin 10% FBS
Caco2-Vollmedium	DMEM High Glucose 1% Penicillin/ Streptomycin 20% FBS
MCF7-Vollmedium	DMEM, Low Glucose 1% Penicillin/ Streptomycin 10% FBS
MCF7-Hungermedium	DMEM, Low Glucose 1% Penicillin/ Streptomycin 5% FBS

**Tabelle 8: Liste der zur Transfektion verwendeten Vektoren**

Name	Beschreibung	Vector Backbone	Quelle
PLB::LUC	Firefly-Luciferase-Reporter des PER2-Promotors	pAB	[218]
BLH::LUC	Firefly -Luciferase-Reporter des BMAL1-Promotors	pAB	[219]
CYP1A1-WT::LUC	Firefly-Luciferase-Reporter des Wildtyp-CYP1A1-Promotors	pT81luc	[220]
CYP1A1-CDEF::LUC	Firefly-Luciferase-Reporter eines nicht induzierbaren CYP1A1-Promotors	pT81luc	[220]
Renilla::LUC	Konstitutiv aktiver Renilla-Luciferase-Expressionsvektor	pRL	[220]
H2B-GFP	Konstitutiv aktiver GFP-Expressionsvektor	pEGFP-N1	Clontech®

## 2.1.4 Molekularbiologie

### 2.1.4.1 Kits

**Tabelle 9: Liste der verwendeten Kits**

Name	Hersteller	Artikelnummer
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega	G9681
Dual-Glo® Luciferase Assay System	Promega	E2920
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	4368814
P450-Glo™ CYP1A1 Assay	Promega	V8752
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	23225
Power UP SYBR® Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific	4268708,0
RNase-Free DNase Set	Qiagen	79254
RNeasy Mini kit	Qiagen	74106
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific	34095

### 2.1.4.2 Oligonukleotide

Alle verwendeten qRT-PCR-Primer wurden so designt, dass sie bei einer Schmelztemperatur von ungefähr 60°C PCR-Produkte einer Größe von 70-200 bp erzeugen. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Primersequenzen Exon-übergreifend waren, um eine Ampifikation genomischer DNA zu vermeiden.

**Tabelle 10: Liste der Oligonukleotide für die qRT-PCR**

Zielgen		Primersequenz 5' → 3'
AHR	forward reverse	AAC GGA GGC CAG GAT AAC TG GAC ATC AGA CTG CTG AAA CCC T
ALDH3A1	forward reverse	TGT AGA GCT CGT CCT GCT GA GCA GAC CTG CAC AAG AAT GA
B2M	forward reverse	CTCCGTGCCTTAGCTGTG TTTGGAGTAGCGTGGATAGCC
BCL2L1	forward reverse	CAG CTT GGA TGG CCA CTT AC TGC TGC ATT GTT CCC ATA GA
BMAL1	forward reverse	AGG ATG GCT GTT CAG CAC ATG A CAA AAA TCC ATC TGC TGC CCT G
CCND1	forward reverse	ACA AAC AGA TCA TCC GCA AAC AC TGT TGG GGC TCC TCA GGT TC
CYP1A1	forward reverse	TTT GAG AAG GGC CAC ATC CG AGG CCT CCA TAT AGG GCA GAT
ER $\alpha$ _a	forward reverse	AAG AGC TGC CAG GCC TGC C TTG GCA GCT CTC ATG TCT CC
ER $\alpha$ _b	forward reverse	CCA CCA ACC AGT GCA CCA TT GGT CTT TTC GTA TCC CAC CTT TC
ER $\alpha$ _c	forward reverse	TGG GAA TGA TGA AAG GTG GGA T GGT TGG CAG CTC TCA TGT CT
GAPDH	forward reverse	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC
PER2	forward reverse	TGA GAA GAA AGC TGT CCC TGC CAT GAC GTT TGC TGG GAA CTC GCA TTT
REVERB $\alpha$	forward reverse	GAG CAC CAG CAA CAT CAC CAA G TCT TGA AGC GAC ATT GCT GGC A

### 2.1.4.3 Antikörper

**Tabelle 11: Liste der für den Western Blot verwendeten Antikörper**

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Polyclonal rabbit anti-ER $\alpha$ (HC-20)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	Sc-543
Monoclonal Mouse anti-CYP1A1 (665 CT6-1-2)	1:500	Abgent	AM2174B
Monoclonal Mouse anti- $\beta$ -Actin, Clone (AC-15)	1:10.000	Sigma-Aldrich	A5441
Monoclonal Mouse anti-GAPDH (6C5)	1:1000	Chemicon	MAB374
Goat-anti-mouse-IgG-HRP	1:20.000	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2031
Goat-anti-rabbit-IgG-HRP	1:20.000	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2004

### 2.1.5 Software

**Tabelle 12: Liste der angewandten Software**

Bezeichnung	Quelle
Adobe Illustrator	Adobe Systems
Chronalyzer	Violet et al. (Manuskript eingereicht)
Excel, Word, Powerpoint, EndNote	Microsoft
GraphPad Prism 8	GraphPad Software
ImageJ	Open Source
Magellan™	Tecan
NanoDrop™ Software	Thermo Fisher Scientific
Photoshop	Adobe Systems
QuantStudio® Software	Thermo Fisher Scientific

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Abhängig vom Endpunkt war eine geeignete Zelllinie auszuwählen, anhand derer die geplanten Analysen durchgeführt werden konnten. Im Fall dieser Arbeit war es entscheidend, dass mit humanen Zellen gearbeitet wird, da das Ziel war, ein *in vitro* Testsystem zu entwickeln, das die Testung potentiell humantoxischer Substanzen unter Berücksichtigung des circadianen Rhythmus zulässt. Des Weiteren lag der Fokus auf der Verwendung nicht transformierter Zellen, um die Physiologie des Herkunftsgewebes möglichst adäquat abzubilden [209, 221, 222]. Daher wurden die künstlich immortalisierten Zelllinien HME1 und M13SV1 verwendet. Da jedoch die Verfügbarkeit immortalisierter Zelllinien sehr viel geringer ist, als die von Krebszelllinien, wurden zur Verifizierung der Testergebnisse in einem anderen Gewebe HCT116- und Caco2-Zellen hinzugezogen, da diese eine synchronisierbare Clockgen-Oszillation aufweisen [209, 214].

### 2.2.2 Kultivierung und Expansion

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (Tabelle 5) wurden mit den in Tabelle 7 aufgeführten Vollmedien bei 95%-iger Luftfeuchtigkeit, 5% CO<sub>2</sub> und 37°C kultiviert. Die Luciferase-Reporterzelllinien der HME1- und HCT116-Zelllinie waren anhand des zuvor beschriebenen Protokolls durch lentivirale Transduktion generiert worden [214].

Zur Expansion der HME1- und M13SV1-Zelllinien wurde die Zellkulturfläche mit Trypsin (Lonza) bedeckt. Nach 6-8 min wurde die Reaktion mit der doppelten Menge TNS gestoppt und der Inhalt der Zellkulturschale in ein Zentrifugengefäß überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 300 g für 4 min wurden die Zellen in frisches Medium aufgenommen und in einem Verhältnis von 1:4 neu ausgesät.

HCT116-, MCF7- und Caco2-Zellen wurden durch einen 8-minütigen Trypsin (Biochrom/Merck)-Verdau abgelöst, in das jeweilige Kulturmedium aufgenommen und in einem Zentrifugationsgefäß für 4 min bei 300 g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde anschließend in einem Verhältnis von 1:10 (HCT116 und MCF7) bzw. 1:3 (Caco2) in frischem Vollmedium ausgesät.

### 2.2.2.1 Entrainment und Behandlung

#### *HME1*

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 1 Mio. Zellen pro 6-Well bzw. 0,1 Mio. pro 96-Well ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt. Nach 3-tägiger Konfluenz wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und über Nacht in Hungermedium überführt. Am darauffolgenden Tag erfolgte das Entrainment entweder für 2 h mit 50%-igem Pferdeserum oder für 1 h mit 1  $\mu$ M Dexamethason oder 10  $\mu$ M Forskolin. Vor der anschließenden Substanzbehandlung in Hungermedium nach Entrainment mit Pferdeserum oder Vollmedium nach den anderen beiden Entrainmentmethoden, erfolgten erneut 2 Waschschrte mit PBS. Die zur Kontrolle dienenden nicht synchronisierten Zellen wurden mit einer Zelldichte von 0,3 Mio. Zellen pro 6-Well bzw. 0,03 Mio. pro 96-Well ausgesät und in Vollmedium behandelt. Wenn nicht anders vermerkt, erfolgte die Behandlung direkt nach dem Entrainment für eine Dauer von 24 h.

#### *M13SV1*

M13SV1-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 0,8 Mio. Zellen pro 6-Well bzw. 0,1 Mio. pro 96-Well ausgesät und am Folgetag mit 1  $\mu$ M Dexamethason für 1 h synchronisiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit PBS und eine 24-stündige Substanzbehandlung im Vollmedium. Nicht synchronisierte Zellen wurden mit einer Dichte von 0,15 Mio Zellen pro 6-Well ausgesät und am darauffolgenden Tag gleichermaßen behandelt.

#### *HCT116*

Zur Synchronisierung der HCT116-Zelllinie wurden die Zellen mit einer Dichte von 1,5 Mio. Zellen pro 6-Well bzw 0,8 Mio. pro 96-Well ausgesät und am Folgetag für 1 h mit 1  $\mu$ M Dexamethason behandelt. Nach einem zweifachen Waschschrte mit PBS erfolgte eine 24-stündige Substanzbehandlung im Vollmedium. Nicht synchronisierte Zellen wurden mit einer Dichte von 0,5 Mio. Zellen pro 6-Well ausgesät und am nächsten Tag ebenfalls für 24 h behandelt.

#### *Caco2*

Caco2-Zellen wurden mit einer Dichte von 0,5 Mio Zellen pro 12-Well ausgesät und 24 h später für 1 h mit 1  $\mu$ M Dexamethason synchronisiert, 2x mit PBS gewaschen und anschließend für 24 h im Zellkulturmedium behandelt. Als nicht synchronisierte

Kontrolle wurden 0,25 Mio Zellen pro 6-Well ausgesät und am nächsten Tag für 24 h mit derselben Substanzlösung behandelt.

### MCF7

MCF7-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 0,3 Mio Zellen pro 6-Well ausgesät und für 24 h in Hungermedium behandelt, ohne synchronisiert zu werden.

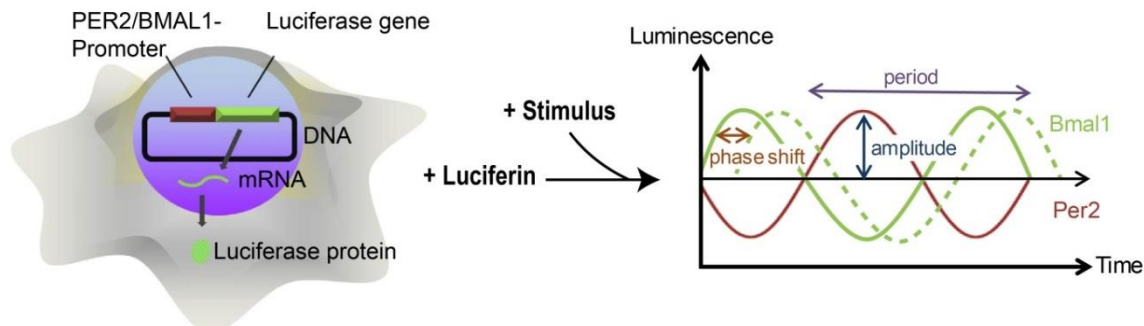
#### 2.2.2.2 Transfektion

Die transiente Transfektion der M13SV1-Zelllinie wurde mittels Elektroporation (220 V; 950  $\mu$ F;  $\Omega = \infty$ ) vorgenommen. Dazu wurden je 1,5 Mio. Zellen in 400  $\mu$ l Opti-MEM resuspendiert und mit 10  $\mu$ g des jeweiligen Plasmids (Tabelle 8) in eine Elektroporationsküvette überführt. Als Kontrolle wurde das H2B-GFP-Konstrukt co-transfiziert. Somit konnte die Transfektionseffizienz im Fluoreszenzmikroskop eingeschätzt werden.

#### 2.2.3 Circadianes Biolumineszenz-Reportersystem

Bei der Etablierung eines circadianen *in vitro* Testsystems ist es von Vorteil, die circadianen Rhythmen der Clockgene „*in vivo*“ visualisieren zu können, da somit Messungen in lebenden Zellen in Echtzeit über mehrere Tage möglich sind, ohne die Zellen aufschließen zu müssen. Dies erspart zudem sehr viel Arbeits- und Zeitaufwand, da bei konventionellen mRNA-Analysen eine Probenentnahme im 2 h-Takt sinnvoll ist, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen [223]. Die gängigen Methoden der Visualisierung des circadianen Rhythmus *in vivo* und *in vitro* sind Fluoreszenz- oder Lumineszenz-basierte Reporterzell-Systeme, die unter der Regulation des Promotors eines der Clockgene stehen [217, 223]. Die jeweiligen Expressionskassetten können transient [224] oder stabil in die Zelle eingebracht werden [225]. Das hier verwendete circadiane Biolumineszenz-Reportersystem beruht auf der Luciferase des Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*), die als Reporter gen den Clockgenen dem *BMAL1*- bzw. dem *PER2*-Promotor nachgeschaltet ist. Die Luciferase katalysiert in Gegenwart seines Substrats Luciferin, Sauerstoff und ATP die Emission von Photonen einer Wellenlänge von ungefähr 560 nm, so dass die circadiane Oszillation der Clockgene indirekt nachgewiesen werden kann (Abbildung 4). Im Gegensatz zu Fluoreszenzreportern, die zwar weitaus stärkere Signale erzeugen, besitzt das Luciferase-System den Vorteil, dass es kein Anregungslicht benötigt, das toxisch auf die Zellen wirken kann. Außerdem ist die Hintergrundemission vergleichsweise zur Autofluoreszenz sehr gering. Des Weiteren ist das

Biolumineszenz-Signal über einen großen Messbereich linear und daher gut quantifizierbar [217].



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des circadianen Biolumineszenz-Reportersystems**

Das Luciferasegen wird über den jeweiligen artifiziiellen Clockgenpromotor reguliert, so dass die Expression des Clockgens indirekt über die Expression der Luciferase nachgewiesen werden kann, wenn Luciferin als Substrat vorliegt. Durch Zugabe eines Stimulus, der zum Entrainment der Zellen führt, können die Oszillationen der Clockgene durch Messung der entstehenden Lumineszenz gemessen werden. Im Folgenden können verschiedene Kurvenparameter, wie die Periode, die Phase und der Amplitude der Schwingung bestimmt werden (aus 7.2.2).

### 2.2.3.1 Messung der circadianen Reporteraktivität

Zur Messung der Biolumineszenz wurden die HCT116- und HME1-Reporterzellen in weißen 96-Wellplatten kultiviert und mit Dexamethason synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen in 0,25 mM D-Luciferin enthaltendem Vollmedium kultiviert und gegebenenfalls behandelt.

M13SV1-Zellen wurden transient mit den *PER2::luc*- oder *BMAL1::luc*-Plasmiden transfiziert (s. 2.2.2.2) und nach 48 h ebenfalls in weiße 96-Wellplatten ausgesät, synchronisiert und mit 0,25 mM D-Luciferin-haltigem Vollmedium bestückt.

Die Reporteraktivität der drei Zelllinien wurde daraufhin im Plattenlesegerät (Synergy Neo2) gemessen. Genauer wurde die Biolumineszenz mit einem Photonencount von 6,5 s pro Well und einer Verstärkung von 125 für bis zu 72 h alle 30 Minuten bestimmt.

Im Anschluss an die Biolumineszenzmessung wurde ein Zellviabilitäts-Assay durchgeführt. Dazu wurde den Herstellerangaben des CellTiter-Blue® Cell Viability Assays gefolgt.

### 2.2.3.2 Analyse der Biolumineszenzdaten

Um Genexpressions- und Biolumineszenz-Daten auf ihre circadiane Oszillation zu untersuchen und präzise Analysen der Kurvenparameter, wie Periode, Amplitude



und Phase, erstellen zu können, bedarf es einer speziellen Software zur Auswertung und Normalisierung der Messdaten [226]. Hier stehen verschiedene Tools zur Verfügung [226-230]. In dieser Arbeit wurde mit einer personalisierten Software namens *Chronalyzer* gearbeitet, welche in der Abteilung 9 des Bundesinstituts für Risikobewertung BfR entwickelt wurde. Diese Software liefert die numerischen Parameterwerte zur Beschreibung der beobachteten Schwingung. Dazu werden die Zeitreihen zunächst gefiltert und normalisiert, so dass die eigentliche Schwingung nur noch um die x-Achse stattfindet und mit einer Kosinus-Funktion (sowie einer e-Funktion zur beobachteten Dämpfung der Schwingung) approximiert werden kann.

### 2.2.4 Genexpressions-Analysen

#### 2.2.4.1 RNA Extraktion und Reverse Transkription

Zunächst wurde die Gesamt-RNA der unterschiedlich behandelten Zellen anhand des *RNeasy Mini Kits* extrahiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend im Well lysiert, bevor sie zum weiteren Prozessieren in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt wurden. Die RNA-Extraktion umfasste einen DNA-Verdau mittels des *RNase Free DNase Sets*. Die photometrische Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA wurde am Nanodrop 2000 durchgeführt.

Im Weiteren wurde je nach RNA-Ausbeute 0,5 oder 1 µg Gesamt-RNA in einer Reversen Transkription eingesetzt, die anhand des Protokolls des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* unter Verwendung des *Mastercycler Nexus gradient* durchgeführt wurde.

#### 2.2.4.2 Quantitative Real Time PCR

Die Genexpression wurde mittels quantitativer Real Time PCR (qRT-PCR) analysiert. Dazu wurden 5 ng der anhand der Reversen Transkription gewonnenen cDNA in Triplikaten mit dem *Power Up SYBR Green Mix* angesetzt und in 384-Wellplatten mit je 0,5 µM der jeweiligen forward- und reverse-Primer (Tabelle 10) zusammengegeben. Als interne Housekeeper wurden Primer für *GAPDH* oder *B2M* verwendet. Die PCR-Reaktion fand im *QuantStudio 7 Flex* unter Verwendung des *SYBR Green*-Protokolls statt. Zur Kontrolle der qRT-PCR-Produkte wurden sie im Anschluss mit Laufpuffer auf 1%-ige Agarosegele aufgetragen und für 30 min bei 140 V aufgetrennt. Die Visualisierung der PCR-Produkte erfolgte durch Gelgreen, mit dem das Agarosegel angesetzt wurde. Die Detektion wurde mit dem Dokumentationssystem *Fusion Solo S* durchgeführt.

Anschließende Analysen der qRT-PCR-Daten wurden anhand der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit der Geräte-zugehörigen Software namens *QuantStudio Real Time PCR Software* durchgeführt und zur weiteren Bearbeitung, Darstellung und statistischen Auswertung in GraphPad Prism exportiert.

### 2.2.5 Proteinexpressions-Analysen

#### 2.2.5.1 Proteinextraktion

Zur Untersuchung der Proteinexpression der HME1-Zellen, wurden sie wie oben beschrieben in 6-Well-Platten ausgesät, synchronisiert und für 24 h behandelt. Anschließend wurden die 6-Well-Platten auf Eis gestellt und mit kaltem PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit je 100  $\mu$ l eiskaltem Boehringer Lysepuffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor im Well lysiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis, wurden die Reaktionsgefäße für 10 Minuten bei 13000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration des Überstands mit Hilfe des *Pierce™ BCA Protein Assay Kits* unter Nutzung eines Plattenlesegeräts (Tecan) bestimmt.

#### 2.2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach Molekularmasse erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Das verwendete Gel setzte sich aus einem 5%-igen Sammelgel und einem 10%-igem Trenngel zusammen. Wenn nicht anders vermerkt, wurden 50  $\mu$ g Protein jeder Probe mit Laemmlipuffer gemischt und für 3 min bei 95°C denaturiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Die Auftrennung in SDS-Laufpuffer erfolgte für die ersten 30 min bei 60 V und daraufhin für ca. 1 h bei 140 V.

#### 2.2.5.3 Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine erfolgte der Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran mittels einer Semi-Dry-Technik. Dazu wurde das Gel zwischen je drei mit Transferpuffer vollgesaugten Filterpapieren auf eine Membran gelegt und im Blot-System bei 25 V für 90 min geblottet. Anschließend wurde die Membran für 2 x 15 min in 6%-igem Milchpulver in TBST-Puffer geblockt, um unspezifische Bindestellen auf der Membran zu reduzieren. Die Inkubation des Erst-Antikörpers erfolgte bei 4°C über Nacht, die des Zweit-Antikörpers für 1 h bei Raumtemperatur. Alle Antikörper-Verdünnungen (Tabelle 11) wurden in 6%-igem Milchpulver in TBST-Puffer hergestellt. Nach jeder Antikörper-Inkubation wurden je 3 Waschschrte mit TBST-Puffer und mit TBS-Puffer durchgeführt. Um die Proteinbanden anschließend zu detektieren, wurde

das *Super Signal West Femto*-Substrat nach Manual-Angaben eingesetzt. Die Aufnahmen der Chemilumineszenz erfolgte im Dokumentations-System *Fusion Solo S*. Die densitometrische Quantifizierung der detektierten Proteinbanden wurde mittels *ImageJ* vorgenommen; zur Normalisierung wurden die *Housekeeper* GAPDH bzw.  $\beta$ -Aktin verwendet.

### 2.2.6 Enzymaktivitätsbestimmung

HME1-Zellen wurden wie oben beschrieben in 6-Wellplatten ausgesät und behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen trypsinisiert und gezählt. Daraufhin wurden 0,3 Mio. Zellen in einer 150  $\mu$ M Luciferin-CEE-Lösung (P450-Glo™ Kit) resuspendiert und in Triplikaten in eine schwarze 96-Wellplatte mit weißen Wells (PerkinElmer) gegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde anhand der Herstellerangaben des *P450-Glo™ CYP1A1 Assay- Kits* fortgefahren. Die Lumineszenz der Proben wurde im Luminometer bestimmt. Anhand einer zeitgleich pipettierten Standardreihe konnte die Menge des umgesetzten Substrats bestimmt werden.

### 2.2.7 mRNA-Stabilitätsmessung

HME1-Zellen wurden wie oben beschrieben in 6-Wellplatten ausgesät und für 16 h mit 2 nM TCDD behandelt. Anschließend wurden nicht synchronisierte und synchronisierte Zellen für 0, 4 und 8 h mit 10  $\mu$ g/ml Actinomycin D bzw. der Lösemittelkontrolle DMSO behandelt. Daraufhin wurde eine Genexpressionsanalyse (s. 2.2.4) von *CYP1A1* durchgeführt.

### 2.2.8 Analyse der Promotoraktivität

Um die Aktivität des *CYP1A1*-Promotors zu untersuchen, wurden M13SV1-Zellen mittels Elektroporation (s. 2.2.2.2) transient mit einem Wildtyp-Promotor, bzw. mit einem mutierten, nicht AHR-induzierbaren Promotor-Luciferase-Konstrukt transfiziert und in 6-Wells ausgesät. Als Kontrolle wurden 5  $\mu$ g eines Konstrukts mit einer konstitutiv aktiven *Renilla*-Luciferase co-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen in 96-Wellplatten überführt und weitere 24 h später nach dem Manual des *Dual-Glo®-Luciferase*- Assays prozessiert. Die Messung der Biolumineszenz wurde im Plattenlesegerät *Synergy Neo2* durchgeführt. Die Auswertung der Messdaten wurde mit *GraphPad Prism* durchgeführt.

### 2.2.9 Auswertung

Alle im Ergebnisteil dargestellten Graphen wurden in *Graphpad Prism* ausgewertet. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der jeweiligen Probe mit der zugehörigen Standardabweichung. Dosis-Wirkungskurven wurden mit Hilfe einer nicht linearen Dosis-Antwort-Sigmoidfunktion mit variabler Steigung (Hill-Funktion) errechnet, deren untere Grenze gleich 0 gesetzt wurde. Die statistische Auswertung der dynamischen Bereiche wurde anhand eines Zweistichproben-t-Tests durchgeführt, der zwei unabhängige Stichproben mit ungleichen Standardabweichungen miteinander vergleicht (Welch-Test).

## 3 Ergebnisse

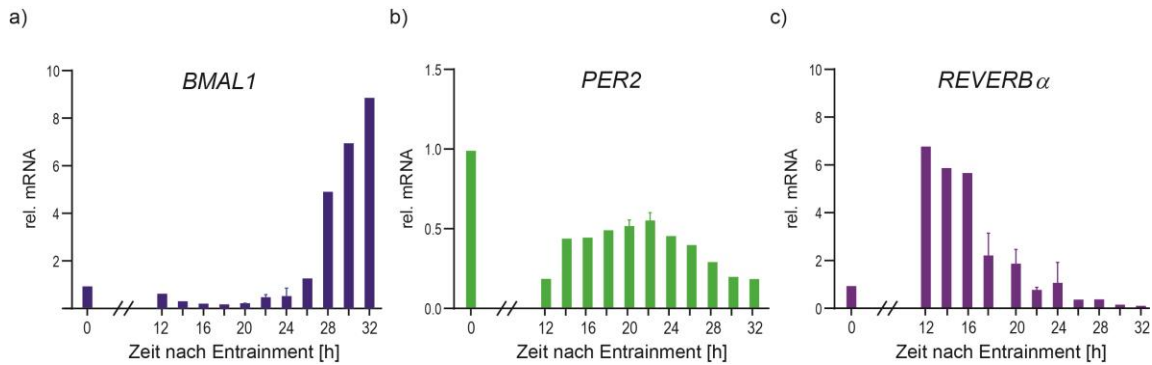
In der Literatur sind eine große Anzahl an Zelllinien aus verschiedenen Geweben beschrieben, die in chronobiologischen Studien Verwendung finden [64]. Hier galt es eine Zelllinie mit robustem circadianen Rhythmus der Clockgene zu finden, die geeignet ist, die Auswirkung einer circadianen Synchronisierung (Entrainment) auf die Ergebnisse eines *in vitro* Testsystems zu ermitteln.

Eine Zelllinie, die einen robusten circadianen Rhythmus nach Serumschock aufweist [92] und aus einem toxikologisch relevanten Gewebe stammt [231], ist die humane Brustepithelzelllinie HME1. Sie wurde durch eine stabile, transgene Expression einer humanen Telomerase-Transkriptase (hTert) immortalisiert, die sie nahezu unbegrenzt vermehrbar macht, ohne dass sie ihre Benignität, ihre Kontaktinhibition oder ihre Zellzykluskontrolle verliert [221, 232].

### 3.1 Charakterisierung der HME1 Zelllinie

#### 3.1.1 Genexpression der Clockgene

Zunächst sollte die Synchronisierbarkeit der *hTERT* HME1-Zellen verifiziert werden. Dazu wurden sie mithilfe des von Basalobre et al. (1998) beschriebenen Protokolls durch einen Serumschock synchronisiert [47]. Genauer wurden die Zellen nach dreitägiger Konfluenz über Nacht in serumfreiem Nährmedium ohne Wachstumsfaktoren (Hungermedium) gehungert und anschließend für zwei Stunden mit 50%-igem Pferdeserum synchronisiert. Anschließend wurde die mRNA der Clockgene *BMAL1*, *PER2* und *REVERB $\alpha$*  über 32 h mittels quantitativer Real Time PCR quantifiziert. Es zeigte sich eine deutliche Oszillation der Genexpression der drei Clockgene. Die Expression von *BMAL1* wies im Zeitraum von 12 bis 24 h ein Minimum auf, die *PER2*-Expression ein Maximum. *BMAL1*- und *PER2*-Expression verliefen also anti-phasisch zueinander, während *REVERB $\alpha$*  ein Expressionsmaximum ca. 6 h vor dem von *PER2* zeigte (Abbildung 5).



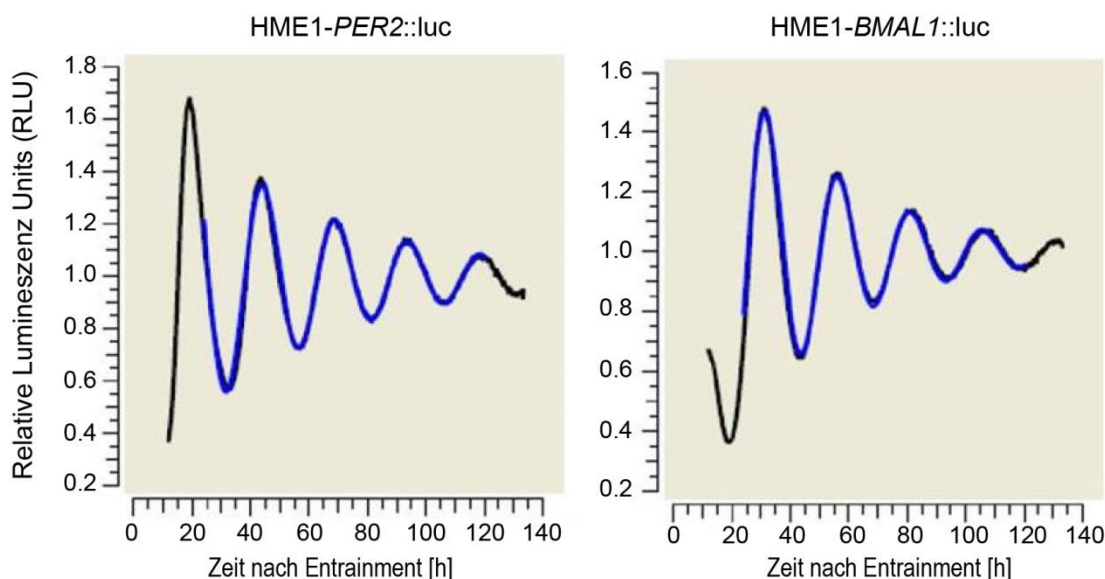
**Abbildung 5 :Circadiane Clockgenexpression der *hTERT* HME1-Zellen**

Relative Genexpression der Clockgene *BMAL1*, *PER2* und *REVERBα* normalisiert auf *B2M* und den Nullwert zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einem Entrainment mittels Serumschock. Jeder Datenpunkt ohne Standardabweichung liegt als Duplikat vor, Datenpunkte mit Standardabweichungen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

Da dies publizierten Daten entspricht [47, 55, 92], konnte somit die Synchronisierbarkeit der HME1-Zellen nachgewiesen werden.

### 3.1.2 Generierung von Biolumineszenz-Reporterzelllinien

Um eine Visualisierung des circadianen Rhythmus der Clockgene *in vitro* über mehrere Tage zu ermöglichen, ohne die Zellen dafür aufschließen zu müssen, wurde ein etabliertes, circadianes Biolumineszenz-Reportersystems verwendet (Abbildung 4) [34, 217, 218]. Für diese Arbeit wurden im Labor von Professor Achim Kramer (Charité Universitätsmedizin Berlin) nach etabliertem Protokoll [214] stabile lentiviral transduzierte Reporterzelllinien der Zelllinie HME1 generiert, in denen das Luciferasegen dem Promotor von *PER2* bzw. *BMAL1* nachgeschaltet ist. Diese Zellen ermöglichen die rhythmische Expression der Clockgene mittels Biolumineszenzmessung mit Hilfe eines Plattenlesegerätes über einen Zeitraum von mehreren Tagen in lebenden Zellen zu verfolgen. Initiale Kontrollmessungen zeigen antiphasische Oszillationen der Luciferaseaktivität von *PER2* und *BMAL1* nach Entrainment (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Initiale Biolumineszenzmessungen der HME1-Reporterzellen**

Messung der relativen Biolumineszenz der mit *PER2::luc*- und *BMAL1::luc*-Konstrukten lentiviral transduzierten HME1-Zellen nach Serumschock im LumiCycle (Charité).

Somit konnte die erfolgreiche Generierung der HME1-Reporterzelllinien bestätigt werden.

### 3.1.3 Responsivität der Zelllinie

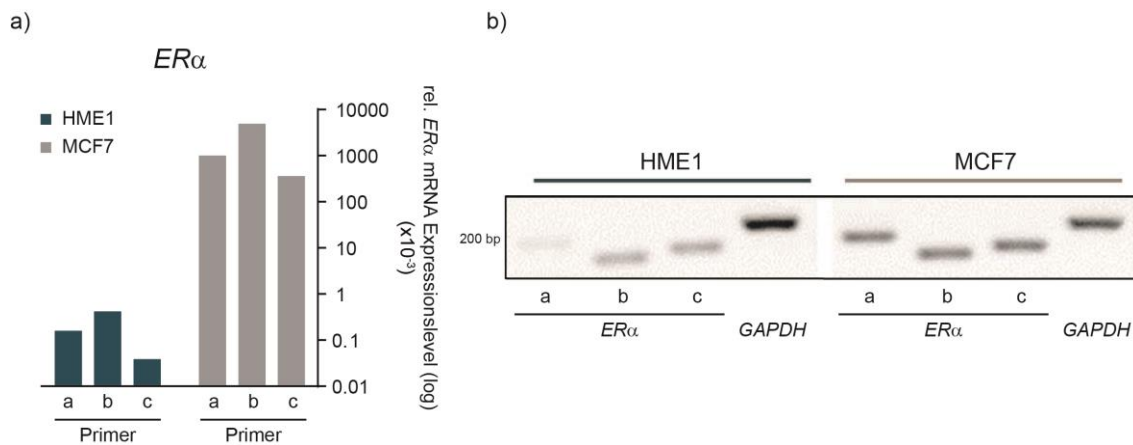
Ziel der Arbeit war es unter anderem, zu ermitteln, ob die circadiane Synchronisierung eines Zellkultur-basierten Testsystems einen Einfluss auf dessen Aussagekraft hat. Daher war eine weitere wichtige Voraussetzung - neben einem robusten Rhythmus - dass die verwendeten Zellen eine Response auf toxikologisch relevante Substanzen aufweisen, die durch die Clock-Maschinerie reguliert sein könnte. Der circadiane Rhythmus reguliert eine Vielzahl von physiologischen Prozessen und Signalwegen. Zwei Beispiele sind der Signalweg des  $ER\alpha$  (s. 1.2.2.2), und der des AHR (s. 1.3.1.1), die beide von großer toxikologischer Relevanz sind, da sie beide bei der Entstehung von Krebs beteiligt sein können [233, 234].

#### 3.1.3.1 Responsivität des Estrogenrezeptors $\alpha$

Für  $ER\alpha$  wurde eine direkte Interaktion mit der Clock-Maschinerie über das Clockgen *PER2* gezeigt [91]. Darüber hinaus wurde die Zelllinie HME1 als  $ER\alpha$ -positiv beschrieben [235, 236]. Daher sollte geprüft werden, ob die Zelllinie geeignet ist, die Auswirkung endokrin aktiver Umweltchemikalien auf die  $ER\alpha$ -vermittelte circadiane Response zu untersuchen (s. 1.2.2.2).

## Ergebnisse

Um zunächst zu überprüfen, ob *ERα* tatsächlich in den HME1-Zellen exprimiert wird, wurden quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)-Analysen mit drei unterschiedlichen *ERα*-Primern durchgeführt. Die entstandenen PCR-Produkte wurden daraufhin auf ein Agarosegel aufgetragen, um sicherzustellen, dass jeweils nur ein spezifisches Produkt aus der PCR resultiert - es handelt sich dabei nicht um eine quantitative Analyse. Als Positivkontrolle wurde die humane Brustkrebszelllinie MCF7 eingesetzt, da diese *ERα* exprimiert und auch nur *ERα*-abhängig proliferiert [237, 238]. Alle drei Primer erzeugten ein PCR-Produkt für *ERα*, dass als eine deutliche Bande im Agarosegel zu erkennen war. Die relative Genexpression von *ERα* erwies sich in HME1-Zellen laut qRT-PCR-Analyse aber als 10000-fach schwächer als in den MCF7-Zellen (Abbildung 7).



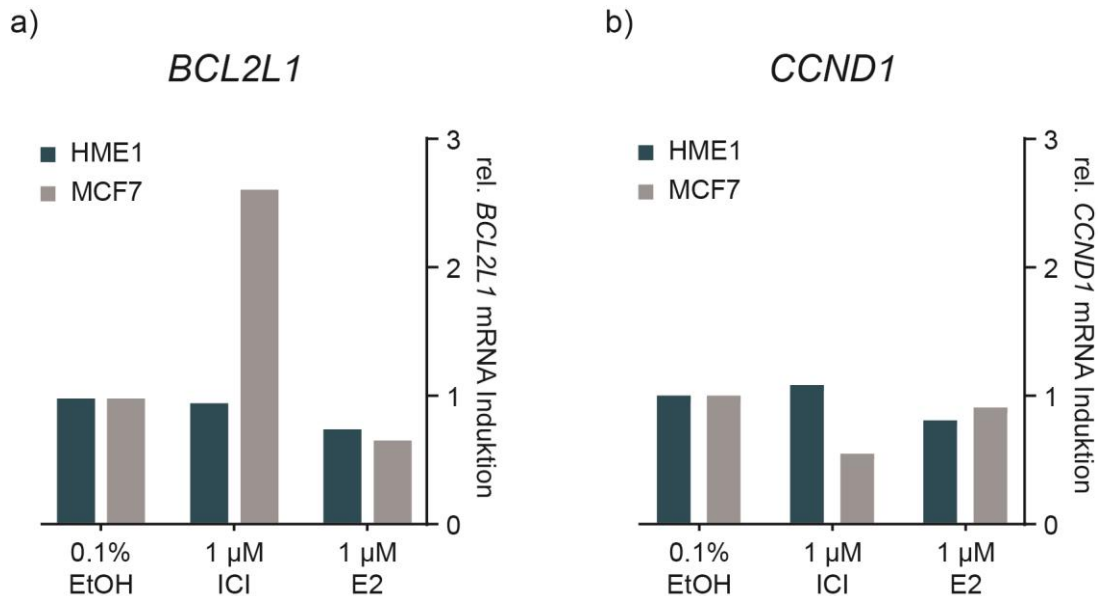
**Abbildung 7: Analyse der *ERα*-Genexpression in HME1 und MCF7 Zellen**

(a) Die Expression von *ERα* wurde unter Verwendung dreier unterschiedlicher Primer (a,b,c) mittels qRT-PCR bestimmt und auf *GAPDH* normalisiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert zweier unabhängiger Experimente. (b) Analyse der PCR Produkte der drei Primerpaare (a, b,c) mit RNA aus HME1 und MCF7 (Positivkontrolle) Zellen mittels Agarosegelelektrophorese.

Um die Funktionalität des *ERα* zu überprüfen, wurde die Genexpression von verschiedenen *ERα*-Zielgenen nach einer 24-stündigen Behandlung mit dem *ERα*-Agonisten 17β-Estradiol ( $E_2$ ) und den *ERα*-Antagonisten ICI-182,780 (ICI) bestimmt. Die MCF7-Zellen wurden identisch behandelt und als Positivkontrolle mitgeführt. Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse der qRT-PCR exemplarisch an den *ERα*-responsiven Genen *BCL2L1* und *CCND1*. Im Gegensatz zu der MCF7-Zelllinie, die eine ca. 2,5-fache Induktion von *BCL2L1* und eine Reduktion der *CCND1*-Induktion um die Hälfte nach ICI-Behandlung aufwies, zeigten HME1-Zellen keine Response auf ICI. Beide Zelllinien zeigten keine Response auf  $E_2$ . In den MCF7 Zellen kann dies dadurch erklärt werden, dass der verwendete Klon sehr stark *ERα* exprimiert und sehr Estrogen-suszeptibel ist [238, 239]. Daher könnte das Estrogenlevel des



Kultivierungsmediums ausreichen, um den ER $\alpha$ -Signalweg zu saturieren (Bischoff und Kornhuber, eingereicht). In den HME1-Zellen würde man dahingegen eine Response auf E<sub>2</sub> erwarten, die ausblieb.

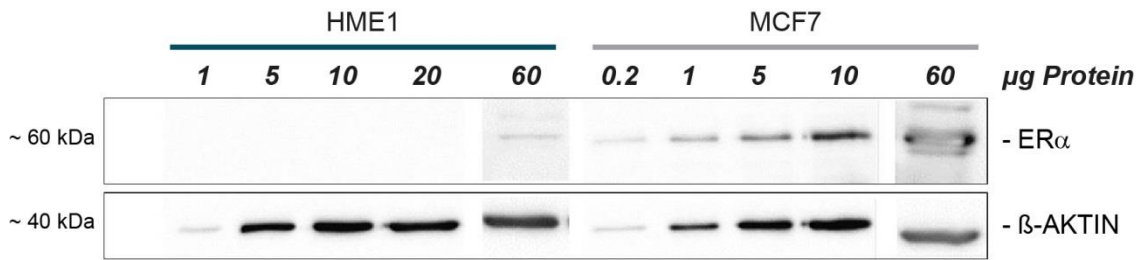


**Abbildung 8: Fehlende mRNA-Regulation nach ICI- und E<sub>2</sub>-Behandlung in HME1-Zellen**

HME1 und MCF7 Zellen wurden für 24 h mit 1  $\mu$ M E<sub>2</sub> oder ICI behandelt und anschließend wurde mittels qRT-PCR die Expression der ER $\alpha$ -responsiven Gens (a) *BCL2L1* und (b) *CCND1* bestimmt. Die Werte wurden auf GAPDH und die Lösemittelkontrolle EtOH normalisiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert zweier unabhängiger Experimente.

Zur Untersuchung, ob die fehlende Zellantwort der HME1-Zellen auf ICI und E<sub>2</sub> auf eine ausbleibende Translation der ER $\alpha$ -mRNA zurückzuführen ist, wurde die basale Proteinmenge des ER $\alpha$  mittels Western Blot Analysen bestimmt. Dazu wurden Proteinlysate aus HME1- und MCF7-Zellen hergestellt und aufsteigende Proteinmengen in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Während ER $\alpha$  in den MCF7-Zellen bereits bei einer aufgetragenen Gesamtproteinmenge von 0.2  $\mu$ g nachweisbar war, war eine schwache Bande in dem entsprechenden kDa-Bereich erst bei 60  $\mu$ g der HME1-Proben detektierbar, deren Spezifität nicht eindeutig ist (Abbildung 9).

## Ergebnisse



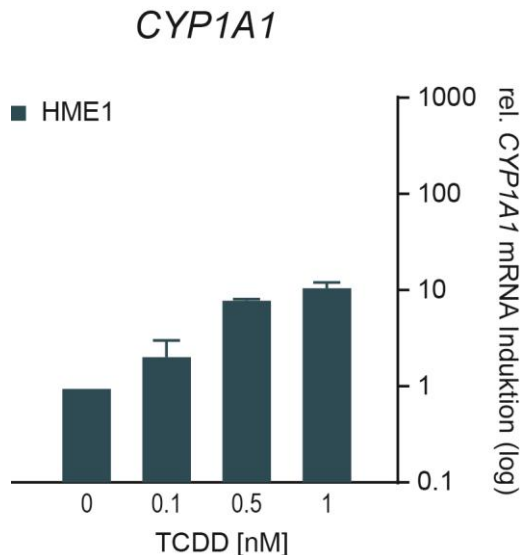
**Abbildung 9: Western Blot Analyse des Estrogenrezeptors  $\alpha$  in HME1- und MCF7-Zellen**

Aufsteigende Mengen von Gesamtproteinlysate der Zelllinien HME1 und MCF7 wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western Blot Analysen gegen ER $\alpha$  und  $\beta$ -Aktin immungefärbt. Die Proteinmenge von 60  $\mu$ g wurde in einer separaten Gelelektrophorese aufgetrennt. Als interne Kontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet.

Da in HME1-Zellen weder eine transkriptionelle Reaktion auf ICI und E<sub>2</sub> (Abbildung 8) noch eine signifikante Menge an ER $\alpha$ -Protein nachweisbar war (Abbildung 9), sind diese Zellen offenbar nicht zur Untersuchung des Estrogen-Signalwegs geeignet.

### 3.1.3.2 Responsivität des Arylhydrocarbonrezeptors

Für den AHR-Signalweg ist eine reziproke Wechselwirkung mit dem circadianen Rhythmus beschrieben [240] (s. 1.3.1.1), was ihn besonders relevant für die Fragestellung des Projektes macht. Als einer der drei Hauptrezeptoren des Fremdstoffmetabolismus (s. 1.3) induziert der AHR Enzyme, die u.a. für den Metabolismus von Dioxinen und dioxin-ähnlichen Substanzen verantwortlich sind, welche als Kontaminanten in der Umwelt vorkommen und sich negativ auf die Gesundheit auswirken können [173]. Ein prominentes Beispiel für solch ein Dioxin ist TCDD, welches als hochpotenter Agonist des AHR in toxikologischen Analysen als Referenzsubstanz für die Aktivierung des AHR-Signalweges Anwendung findet und zu einer Induktion des Cytochroms CYP1A1 führt [132, 241-243]. Um nun die HME1-Zellen auf ihre Responsivität des AHR zu untersuchen, wurden die Zellen für 24 h mit aufsteigenden TCDD-Konzentrationen behandelt. In den HME1-Zellen führte die TCDD-Behandlung zu einer dosis-abhängigen CYP1A1-Induktion (Abbildung 10).

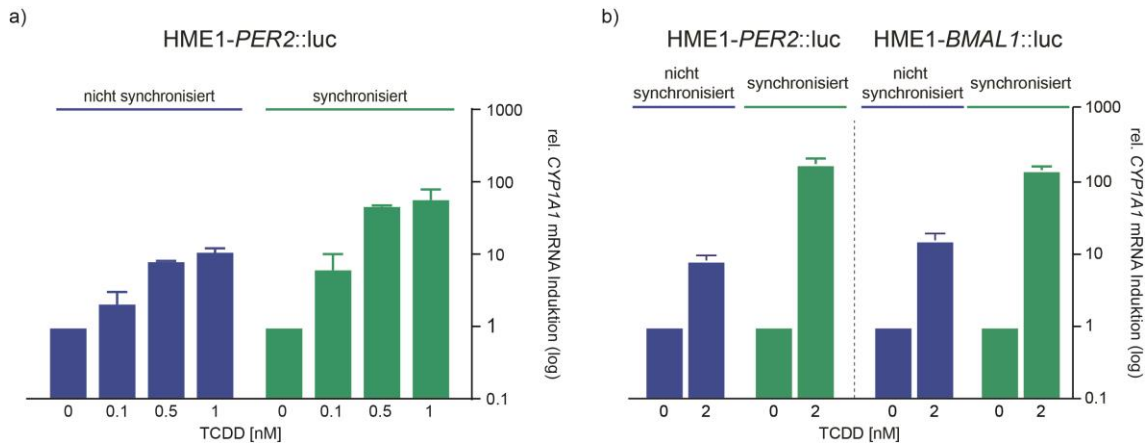


**Abbildung 10: TCDD induziert CYP1A1 in HME1-Zellen**

Quantitative RT-PCR-Analyse der dosis-abhängigen *CYP1A1*-Induktion nach 24-stündiger TCDD-Behandlung normalisiert auf *B2M* und die interne Lösemittelkontrolle DMSO. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

Diese dosis-abhängige *CYP1A1*-Induktion wurde in nicht synchronisierten Zellen untersucht, wie es i.d.R. in konventionellen *in vitro* Tests der Fall ist. Um nun zu untersuchen, ob sich die Response der HME1-Zellen auf TCDD verändert, wenn sich die Zellen in der gleichen circadianen Phase befinden, wurde ein Teil der Zellen vor der 24-stündigen Behandlung mit TCDD mittels eines Serumschocks synchronisiert.

Im Vergleich zu den konventionell behandelten Zellen (nicht synchronisiert) erkennt man in den synchronisierten Zellen bei jeder verwendeten TCDD-Dosis eine erhöhte *CYP1A1*-Induktion (Abbildung 11a). Diese erhöhte Induktion konnte sowohl in der *PER2::luc*-Reporterzelllinie, als auch in der *BMAL1::luc*-Reporterzelllinie nachgewiesen werden, ist also unabhängig von dem Reportersystem, bzw. dem Zellklon (Abbildung 11b).

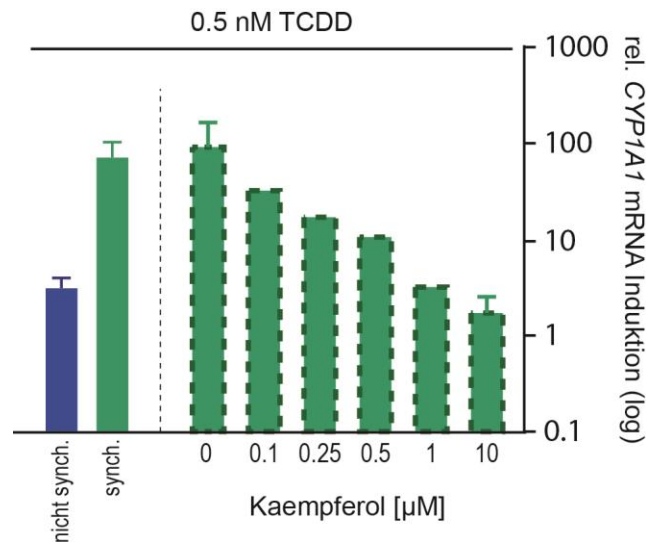


**Abbildung 11: Erhöhte *CYP1A1*-Induktion in synchronisierten HME1-Zellen nach TCDD-Behandlung**

Quantitative RT-PCR-Analyse der dosis-abhängigen *CYP1A1*-Induktion nach 24-stündiger TCDD-Behandlung in nicht synchronisierten und mittels Serumschock synchronisierten HME1-Zellen normalisiert auf *B2M* und die interne Lösemittelkontrolle DMSO. (a) Aufsteigende Konzentrationen von TCDD in HME1-*PER2*-Reporterzellen (b) Vergleich der Induktion durch 2 nM TCDD in HME1-*PER2*- und *BMAL1*-Reporterzellen. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

Folgende Gen- und Proteinexpressionsanalysen, sowie die Messung der Enzymaktivität von *CYP1A1* wurden anhand der HME1-*PER2*::luc-Reporterzelllinie durchgeführt, welche im weiteren Verlauf kurz HME1 genannt wird.

Im Folgenden galt es zunächst zu ermitteln, ob die festgestellte *CYP1A1*-Induktion der HME1-Zellen AHR-vermittelt ist. Dazu wurden die synchronisierten Zellen 24 h parallel mit 0.5 nM TCDD und aufsteigenden Konzentrationen des AHR-Antagonisten Kaempferol behandelt. Eine darauf folgende Bestimmung der *CYP1A1*-Induktion zeigte eine Abnahme der CYP-Induktion mit zunehmender Kaempferol-Konzentration (Abbildung 12). Somit wurde bestätigt, dass die Zellantwort über den AHR vermittelt wurde.



**Abbildung 12: CYP1A1-Induktion in synchronisierten HME1-Zellen ist AHR-vermittelt**

Quantitative RT-PCR-Analysen nicht-synchronisierter und mittels Serumschock synchronisierter HME-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 0.5 nM TCDD mit aufsteigenden Kaempferol-Konzentrationen, normalisiert auf *B2M* und die Lösemittelkontrolle DMSO. Jeder Datenpunkt mit Standardabweichungsbalken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente. Balken ohne Standardabweichung basieren auf einmalig durchgeführten Analysen.

HME1-Zellen zeigten also eine AHR-vermittelte, synchronisations-abhängige Response und eigneten sich somit für die Etablierung des circadianen *in vitro* Testsystems.

### 3.1.4 Vergleich der Verwendbarkeit verschiedener Entrainment-Protokolle für das Testsystem

Das Entrainment kultivierter Zellen, die nicht auf Lichtstimuli reagieren, ist mittels unterschiedlicher chemischer Stimuli [47, 54-56] und auch rhythmischer Temperaturschwankungen möglich [244, 245] (s. 1.2.1.2). Dabei hängt die Auswahl des Entrainments von der jeweiligen Zelllinie und der damit geplanten Versuche ab. Um optimale Bedingungen für dieses Testsystem zu gewährleisten, wurden unterschiedliche Entrainmentprotokolle getestet.

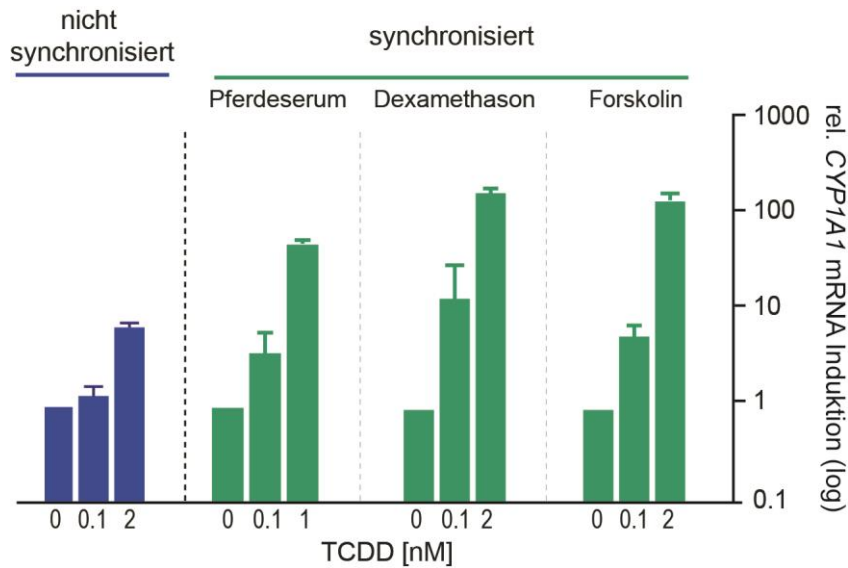
#### 3.1.4.1 Nachteile des Entrainments durch Serumschock

Die in den Vorversuchen verwendete Synchronisierung der Zellen mittels Serumschock bewirkte eine robuste Oszillation der Clockgene und eine synchronisations-abhängige *CYP1A1*-Induktion. Es handelt sich dabei um eine gängige Methode [47], die bereits zuvor erfolgreich zur Synchronisierung von HME1-Zellen verwendet wurde [92, 235]. In einer vergleichenden Untersuchung in Biolumineszenz-Reporterzellen (Rat1-Fibroblasten) wurden neben dem Serumschock

eine Synchronisierung mit Dexamethason, Forskolin oder dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) als effektiv bei der Erzeugung von Rhythmen mit hoher Amplitude beschrieben [54]. Allerdings ist der Mechanismus des Serumschock-Entrainments weitestgehend ungeklärt [56], es wurde lediglich beschrieben, dass es die Expression der *Immediate early genes* bewirkt, die ebenfalls im SCN durch Licht induziert werden [47]. Unabhängig davon handelt es sich bei Seren grundsätzlich um Gemische, deren genaue Zusammensetzung nicht definiert ist, welche zusätzlich zwischen den Chargen variieren kann. Ein weiterer Nachteil des Serumschockprotokolls ist, dass die Behandlung nach dem Serumschock in Mangelmedium erfolgen soll [235]. Daraus ergibt sich eine zeitliche Einschränkung der Experimentdauer. In diesem Testsystem sollte aber untersucht werden, ob sich die Response zeitabhängig verändert. Daher war das Entrainment mittels Serumschock suboptimal für die geplanten Analysen.

### **3.1.4.2 Vergleich der *CYP1A1*-Induktion nach Entrainment mit unterschiedlichen Methoden**

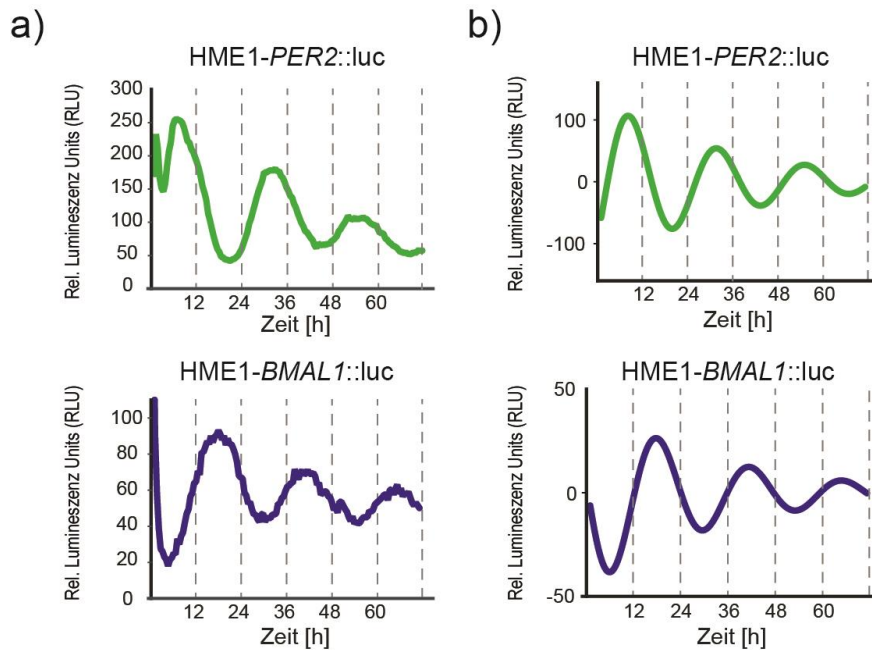
Im Gegensatz zum Pferdeserum sind Dexamethason und Forskolin definierte Substanzen, die folglich keinen Schwankungen in der Zusammensetzung unterliegen. Ein Vergleich der *CYP1A1*-Induktion durch 24-stündige TCDD-Behandlung nach Entrainment mit Pferdeserum, Dexamethason und Forskolin zeigte ebenfalls erhöhte Werte der *CYP1A1*-Induktion in den synchronisierten Zellen, wobei Dexamethason die *CYP1A1*-Induktion am effektivsten auslöste (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Unterschiedlich circadian synchronisierte Zellen zeigen erhöhte CYP1A1-Induktion**

Quantitative RT-PCR-Analyse der CYP1A1-Induktion in nicht synchronisierten und durch drei unterschiedliche Stimuli (Pferdeserum, Dexamethason, Forskolin) synchronisierten HME1-Zellen nach 24-stündiger TCDD-Behandlung. Die Werte wurden auf B2M und die interne Lösemittelkontrolle DMSO normalisiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

Da Glucocorticoide die Expression der Clockgene der peripheren Oszillatoren *in vivo* regulieren (s. 1.2.2.2) [57] kommt ein *in vitro* Entrainment mit dem künstlichen Glucocorticoid Dexamethason der physiologischen Situation bereits sehr nahe [55]. Außerdem kann die Folgebehandlung in Vollmedium stattfinden. Eine Analyse der Luciferaseaktivität der Reporterzelllinien nach Dexamethason-Entrainment zeigte des Weiteren eine robuste circadiane Clockgen-Oszillation der HME1-Reporterzelllinien (Abbildung 14 a+b).

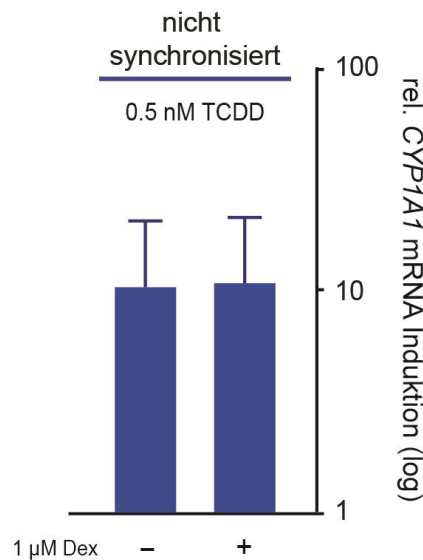


**Abbildung 14: Dexamethason-Entrainment erzeugt robuste circadiane Oszillation in HME1-Zellen**

Repräsentative Rohdaten der Biolumineszenz (a) und mittels der Software Chronalyzer gefittete Biolumineszenzkurven (b) der beiden Reporterzelllinien HME1-*PER2::luc* und HME1-*BMAL1::luc* nach Dexamethason-Entrainment.

Um einen Einfluss von Dexamethason auf die AHR-vermittelte Geninduktion des Testsystems auszuschließen, wurde zusätzlich überprüft, ob semi-konfluente Zellen, die nicht über Nacht gehungert wurden, eine Veränderung der *CYP1A1*-Induktion nach TCDD-Behandlung zeigen, wenn sie zuvor für eine Stunde mit Dexamethason behandelt wurden (Abbildung 15). Da dies nicht der Fall ist, kann schlussgefolgert werden, dass Dexamethason nicht mit der beobachteten transkriptionellen Response interferiert. Daher wurde im Weiteren mit Dexamethason als Stimulus zur circadianen Synchronisierung der Zellen gearbeitet.





**Abbildung 15: CYP1A1 wird in semi-konfluenten, nicht gehungerten HME1- Zellen nicht durch Dexamethason induziert**

Relative *CYP1A1*-Induktion in semi-konfluenten, nicht gehungerten HME1-Zellen nach TCDD-Behandlung ohne und mit vorgeschalteter einstündiger Dexamethason-Behandlung. Die *CYP1A1*-Induktion wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf *B2M* und die interne Lösemittelkontrolle DMSO normalisiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

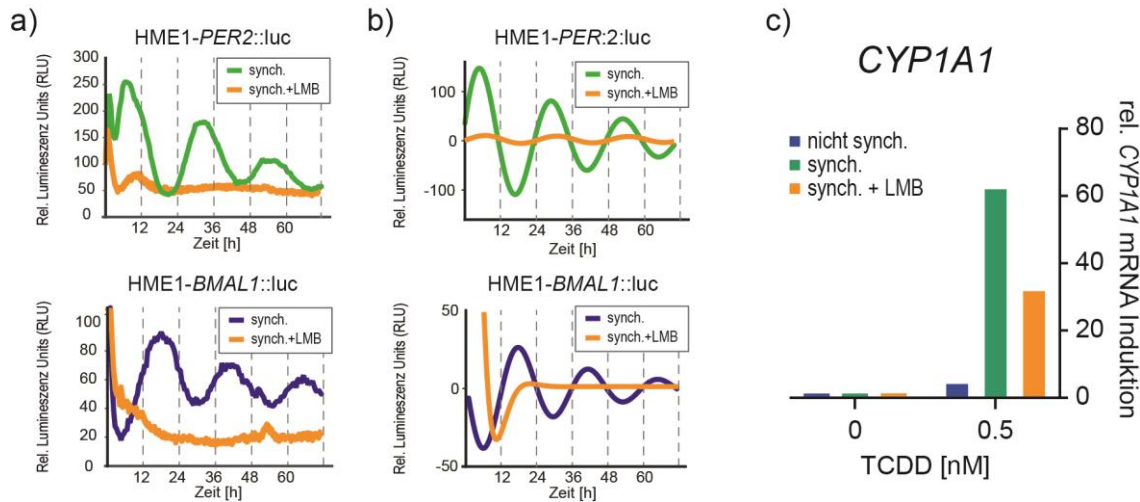
### 3.1.5 Hemmung des circadianen Rhythmus durch spezifische Inhibitoren

Um den direkten Zusammenhang der veränderten Zellantwort mit der circadianen Synchronität der Zellen nachzuweisen, wurden Substanzen getestet, die den Rhythmus auf Zellebene inhibieren, also mit der Clock-Maschinerie interferieren.

#### 3.1.5.1 Hemmung des circadianen Rhythmus durch Inhibition des Kernexports

Da der Kernimport und -export eine wesentliche Voraussetzung für die Aufrechterhaltung des circadianen Rhythmus der Zelle ist [246], wurde zunächst der Exportinhibitor Leptomycin B (LMB) eingesetzt. HME1-Zellen, die nach dem Dexamethason-Entrainment mit LMB behandelt wurden, zeigten eine nahezu unmittelbare Störung der Reporterogen-Oszillation. Während die LMB-behandelte *PER2*-Reporterzelllinie eine initiale Schwingung mit stark verringerter Amplitude zeigte, war der Rhythmus in den *BMAL1*-Reporterzellen 18 h nach Entrainment durch LMB bereits komplett inhibiert (Abbildung 16 a+b). Die Induktion von *CYP1A1* in

synchronisierten Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit TCDD wurde durch eine parallele Behandlung mit LMB auf ungefähr die Hälfte reduziert (Abbildung 16 c).



**Abbildung 16: Inhibition des Kernexports hemmt den circadianen Rhythmus in HME1-Zellen**

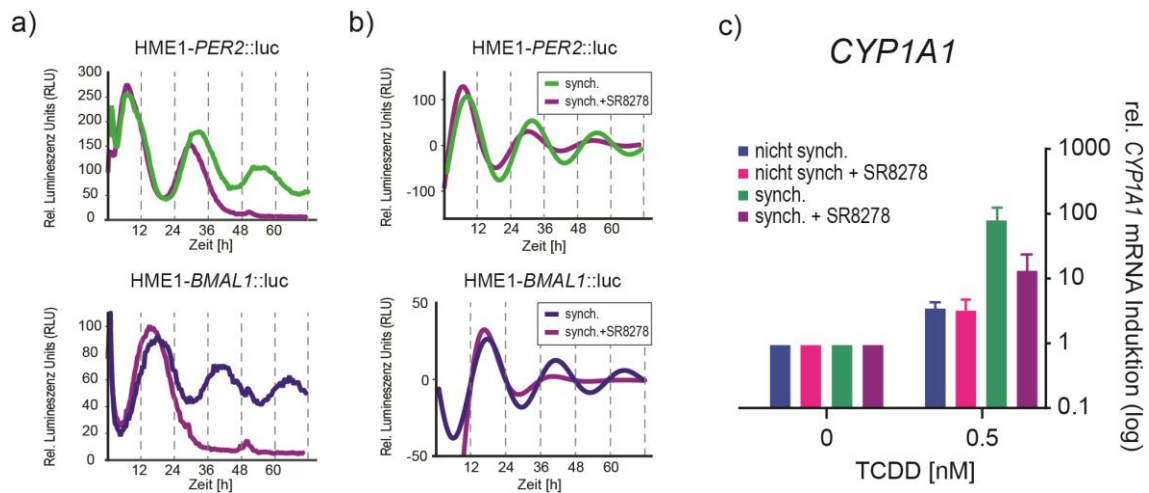
Repräsentative Rohdaten der Biolumineszenz (a) und mittels der Software Chronalyzer gefittete Biolumineszenzkurven (b) der beiden synchronisierten Reporterzelllinien mit und ohne Behandlung mit 5 ng/ml LMB. (c) *CYP1A1*-Induktion in TCDD-behandelten, nicht synchronisierten und mit Dexamethason synchronisierten HME1-Zellen mit und ohne zusätzliche Behandlung mit 5 ng/ml LMB. Die *CYP1A1*-Induktion wurde einmalig mittels qRT-PCR bestimmt und auf *B2M* und die interne Lösemittelkontrolle DMSO normalisiert.

LMB ist ein sehr potenter Inhibitor des nuklearen Exports, der nachweislich den Rhythmus der HME1-Reporterzelllinien stört (Abbildung 16 a+b), allerdings ist er nicht spezifisch für Clockgene. Durch eine Inhibition des Exportrezeptors CRM1 werden alle Proteine am Export gehindert, die eine Kernexportsequenz tragen [246-248]. Dazu gehört zum Beispiel der AHR [249], welcher für die Untersuchung der synchronisations-abhängigen Response ausgewählt wurde. Entsprechend eignet sich dieser Inhibitor nicht für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit.

### 3.1.5.2 Circadiane Disruption durch Inhibition von REVERB $\alpha$

Um einen spezifischeren Effekt auf den zellulären, circadianen Rhythmus zu erzielen, wurde die Substanz SR8278 eingesetzt. Dieser von Kojetin et al. (2011) synthetisierte Inhibitor wirkt antagonistisch auf REVERB $\alpha$ , welches als reprimierender Faktor an der Regulation von BMAL1 beteiligt ist (s. 1.2) [250]. Eine Behandlung der HME1-Zellen mit SR8278 nach Entrainment führte zu einer Desynchronisation des circadianen Rhythmus, die in beiden Lumineszenz-Reporterzelllinien nach ca. 28 h nachweisbar war (Abbildung 17 a+b). Die Induktion von *CYP1A1* in synchronisierten Zellen nach 24-stündiger TCDD-Behandlung wurde durch eine parallele Behandlung

mit SR8278 auf ca. 17% reduziert, während nicht synchronisierte Zellen keine Veränderung in der *CYP1A1*-Induktion aufwiesen, wenn sie zusätzlich zu TCDD mit SR8278 behandelt wurden (Abbildung 17 c).



**Abbildung 17: Inhibition von REVERB $\alpha$  hemmt den circadianen Rhythmus HME1-Zellen**

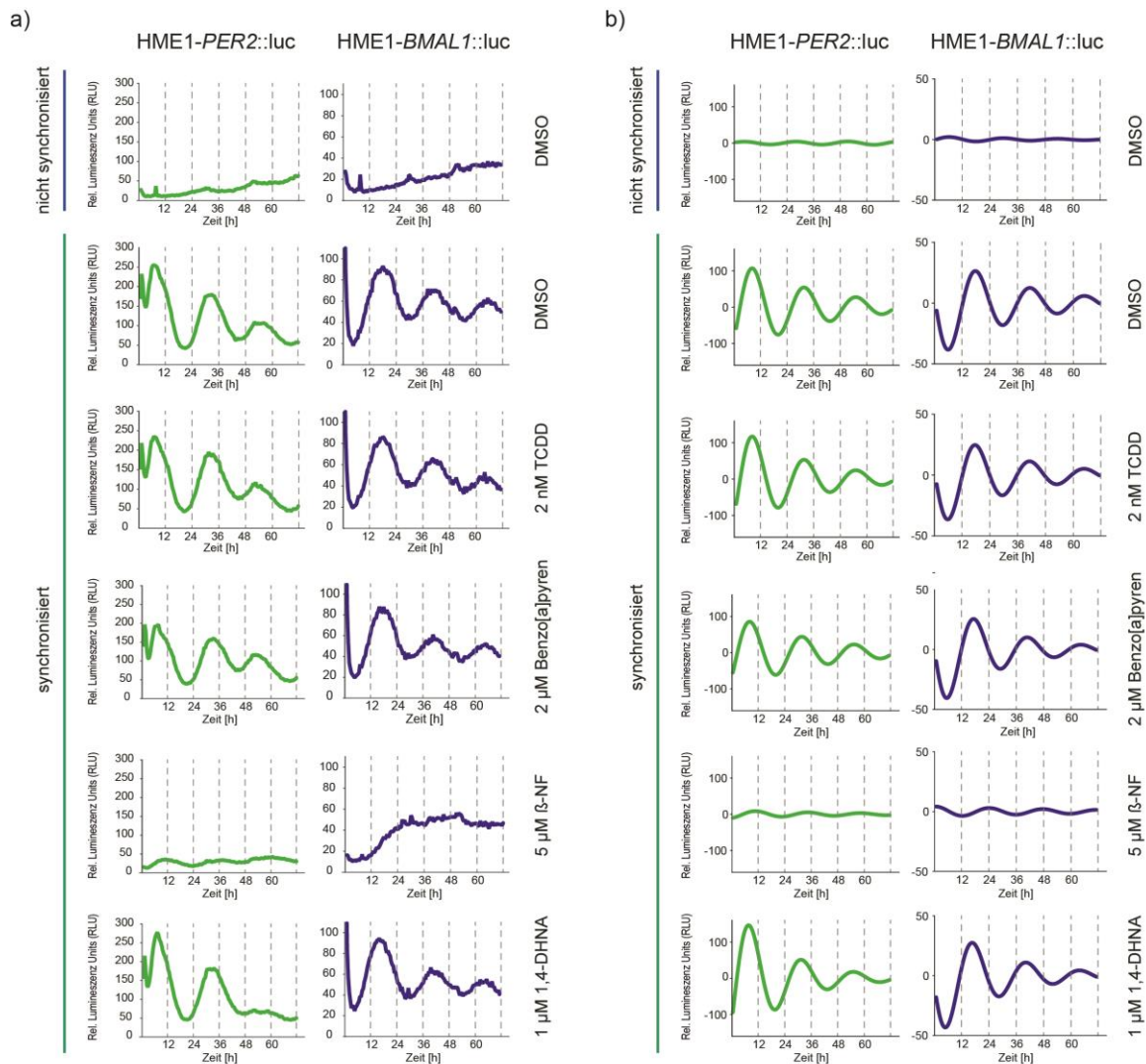
(a) Repräsentative Rohdaten der Biolumineszenz und (b) mittels der Software *Chronalyzer* geffittete Biolumineszenzkurven der beiden synchronisierten Reporterzelllinien mit und ohne Behandlung mit 10  $\mu$ M SR8278. (c) *CYP1A1*-Induktion in für 24 h mit TCDD behandelten HME1-Zellen im nicht synchronisierten und synchronisierten Zustand und mit zusätzlicher Behandlung mit 10  $\mu$ M SR8278. Die *CYP1A1*-Induktion wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf *B2M* und die interne Lösemittelkontrolle DMSO normalisiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass es sich bei der erhöhten *CYP1A1*-Induktion um eine synchronisations-spezifische Response der HME1-Zellen handelt.

### 3.2 AHR-Agonisten interferieren nicht mit zellulärem Rhythmus

Neben der Fragestellung, ob ein Entrainment die Response *in vitro* beeinflusst, galt es zu ermitteln, ob sich die für die Etablierung des Testsystems ausgewählten Substanzen auf den Rhythmus der Clockgene auswirken. Um dies zu untersuchen, wurden die HME1-Reporterzelllinien direkt nach einem Dexamethason-Entrainment mit den AHR-Agonisten TCDD, Benzo[a]pyren (BaP),  $\beta$ -Naphthoflavon ( $\beta$ -NF) und 1,4-DHNA behandelt und für 72 h in Gegenwart des Substrats D-Luciferin in einem Plattenlesegerät inkubiert (Abbildung 18 a+b). Während die nicht synchronisierten Zellen (oben) keine rhythmische Oszillation aufwiesen, zeigten synchronisierte Zellen rhythmische Oszillationen von *PER2::LUC* und *BMAL1::LUC*, die sich antiphasisch zueinander verhielten. Die Xenobiotika-Behandlung der Zellen führte zu keiner deutlichen Veränderung des Rhythmus. Ausschließlich nach einer Behandlung mit  $\beta$ -

NF war kein Rhythmus mehr erkennbar. Dies könnte allerdings auch auf eine Interaktion von  $\beta$ -NF und der Luciferase-Aktivität zurückzuführen sein [251].

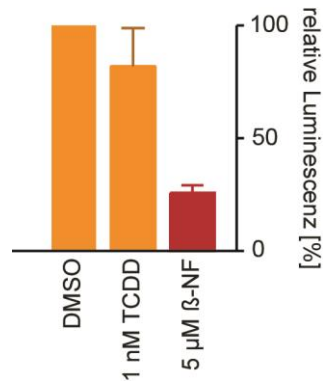


**Abbildung 18: Einfluss der AHR-Agonisten auf die Reporter-Gen-Oszillation in HME1-Zellen**

Repräsentative Biolumineszenzdaten von nicht synchronisierten und synchronisierten Zellen der HME1-*PER*-(links) und der HME1-*BMAL*-Reporterzelllinie (rechts) als (a) Rohwerte und (b) mittels der Software Chronalyzer gefittete Kurven. Die Behandlung der Zellen mit TCDD, BaP,  $\beta$ -NF und 1,4-DHNA erfolgte direkt nach dem Dexamethason-Entrainment.

Zur Kontrolle, ob es sich tatsächlich um eine Wechselwirkung mit der Luciferaseaktivität handelte, wurde ein zellfreier Enzymaktivitäts-Assay durchgeführt. Dazu wurde  $\beta$ -Naphthoflavon mit Luciferin und Luciferase zusammen gegeben und anschließend die Biolumineszenz der Probe bestimmt. Als Referenz für die maximal mögliche Lumineszenz wurde DMSO eingesetzt, TCDD galt als zusätzliche Kontrolle, da hier keine Interferenz mit der Lumineszenzmessung festgestellt worden war.

Tatsächlich sank die Enzymaktivität der Luciferase nach Zugabe von  $\beta$ -NF um 80%, während sie durch TCDD unbeeinflusst blieb (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Inhibitorischer Effekt von  $\beta$ -NF auf Luciferaseaktivität**

Enzymaktivität der Luciferase gemessen als relative Lumineszenz (normalisiert auf DMSO) nach Behandlung mit TCDD und  $\beta$ -NF. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

Durch diesen Versuch konnte also eine direkte inhibitorische Wirkung von  $\beta$ -NF auf die Luciferaseaktivität bestätigt werden. Die Biolumineszenz-messung ist demnach keine geeignete Methode, um den Einfluss von  $\beta$ -NF auf die Reporter-gen-Oszillation zu bestimmen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass TCDD, BaP und 1,4-DHNA keine Veränderung der Reporter-gen-Oszillation der HME1 verursachen, der uniforme circadiane Rhythmus der synchronisierten Zellen also nicht beeinflusst wird.

### 3.3 Entrainment führt zu verstärkter Response in HME1-Zellen nach Substanzexposition

Es wurde gezeigt, dass eine 24-stündige TCDD-Behandlung zu einer verstärkten transkriptionellen Response in synchronisierten HME1-Zellen führt und dass weder TCDD noch andere AHR-Agonisten einen Einfluss auf die Reporter-gen-Oszillation der HME1-Zellen haben. Im weiteren Verlauf wurde nun geprüft, ob sich das durch TCDD-Behandlung erzielte Ergebnis der synchronisations-abhängigen Response auf die anderen AHR-Agonisten und andere Zielgene des AHR übertragen lässt.

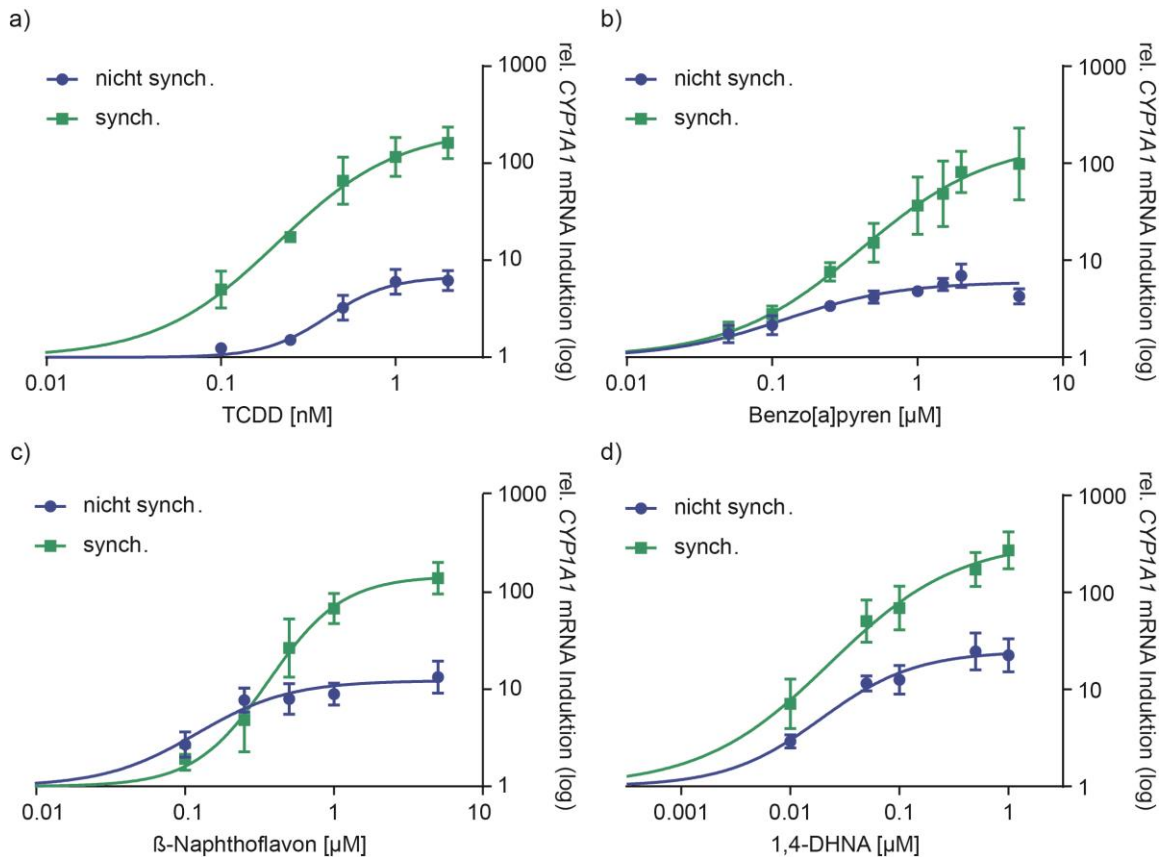
### 3.3.1 Testung zusätzlicher AHR-Agonisten

#### 3.3.1.1 Entrainment verstärkt die dosisabhängige Response

Zur Ermittlung, ob neben TCDD auch andere AHR-Agonisten zu einer erhöhten *CYP1A1*-Induktion nach Entrainment führen, wurden nicht synchronisierte und synchronisierte HME1-Zellen für 24 h mit aufsteigenden Konzentrationen von BaP,  $\beta$ -NF und 1,4-DHNA behandelt. Anschließend wurde die mRNA-Induktion von *CYP1A1* mittels qRT-PCR bestimmt und als Dosis-Wirkungskurve aufgetragen.

Eine Behandlung mit TCDD und 1,4-DHNA zeigte bereits bei der geringsten eingesetzten Konzentration eine im Vergleich zu den nicht synchronisierten Zellen erhöhte Geninduktion in den synchronisierten Zellen (Abbildung 20 a+d). Dagegen rief die Behandlung mit  $\beta$ -NF und BaP erst deutliche Induktionsunterschiede bei jeweils 0,25  $\mu$ M hervor (Abbildung 20 b+c). Die maximale Konzentration erzeugte bei jeder Substanz eine mindestens verzehnfachte Induktion von *CYP1A1* in den synchronisierten Zellen, wobei eine Behandlung mit TCDD den stärksten Effekt erzeugte (ca. 15-fach) (Abbildung 20 a). Weiterhin waren Unterschiede in den Dosis-Wirkungskurven der nicht synchronisierten Zellen zu erkennen. Diese verliefen bei der BaP- und  $\beta$ -NF-Behandlung (Abbildung 20 b+c) - im Gegensatz zur TCDD- und 1,4-DHNA-Behandlung - (Abbildung 20 a+d) nicht sigmoidal. Offenbar tritt die Sättigung hier in den nicht synchronisierten Zellen früher ein als in den synchronisierten Zellen.





**Abbildung 20: Erhöhte *CYP1A1*-Induktion durch Entrainment in HME1-Zellen**

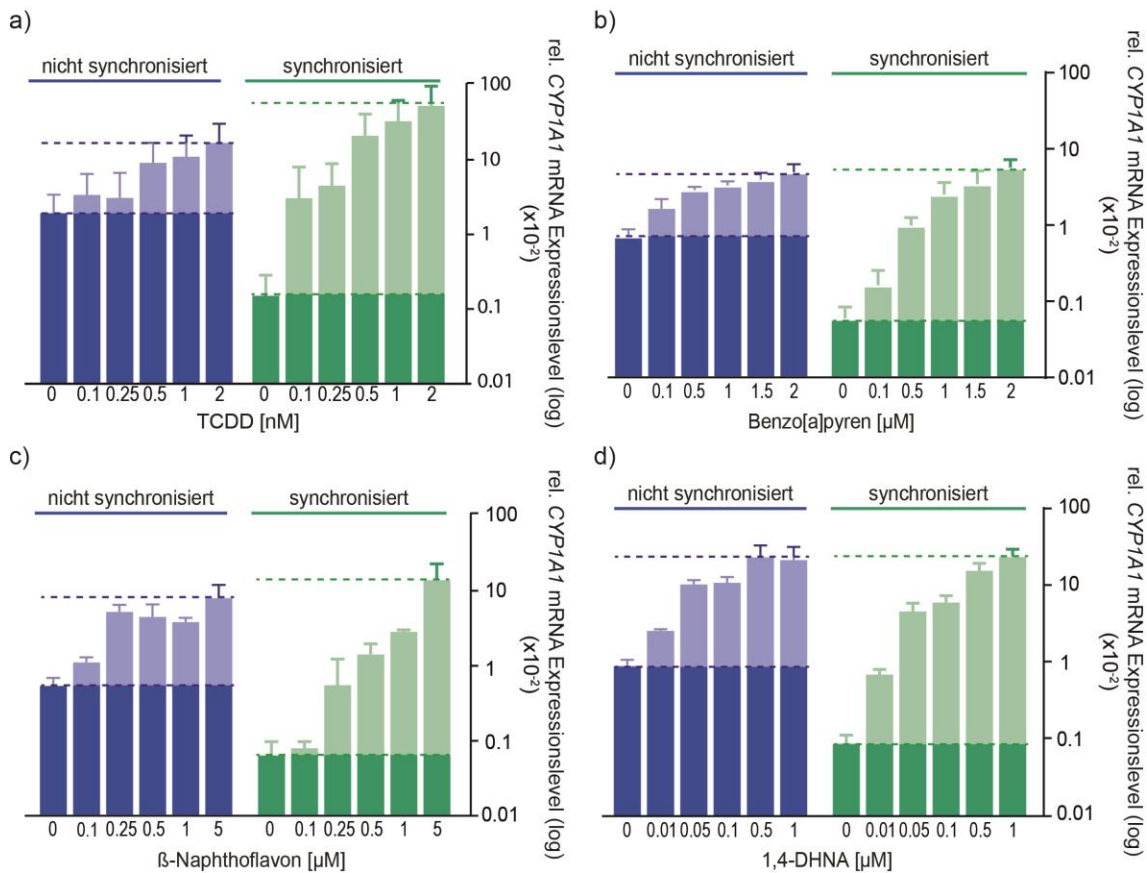
Nicht synchronisierte und synchronisierte HME1-Zellen wurden für 24 h mit steigenden Konzentrationen von (a) TCDD, (b) BaP, (c)  $\beta$ -NF und (d) 1,4-DHNA behandelt. Anschließend wurde die Expression von *CYP1A1* mittels qRT-PCR bestimmt und auf *B2M* und die interne Lösemittelkontrolle DMSO normalisiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

Diese Versuche zeigen, dass die vier verschiedenen AHR-aktivierenden Substanzen eine erhöhte transkriptionelle Response in HME1-Zellen hervorrufen, wenn die Zellen zuvor circadian synchronisiert wurden.

### 3.3.1.2 Erhöhter dynamischer Bereich der *CYP1A1*-Expression

Um den Ursachen der erhöhten Induktion nachzugehen, wurde eine detailliertere Untersuchung der Genexpression von *CYP1A1* vorgenommen. Diese zeigte eine deutlich geringere *CYP1A1*-Basalexpression in Zellen 24 h nach Synchronisierung im Vergleich zu nicht synchronisierten Zellen. Gleichzeitig konnte eine deutlich erhöhte maximale Induktion durch TCDD und  $\beta$ -NF in den synchronisierten Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu befand sich die maximale Induktion bei einer Behandlung mit BaP und 1,4-DHNA in nicht synchronisierten und synchronisierten Zellen auf dem gleichen Niveau. Schlussendlich

resultierte daraus ein erweiterter dynamischer Bereich des *CYP1A1*-Expressionslevels für alle vier AHR-Agonisten (Abbildung 21).



**Abbildung 21: *CYP1A1*-Genexpression in HME1-Zellen nach Xenobiotika-Behandlung**

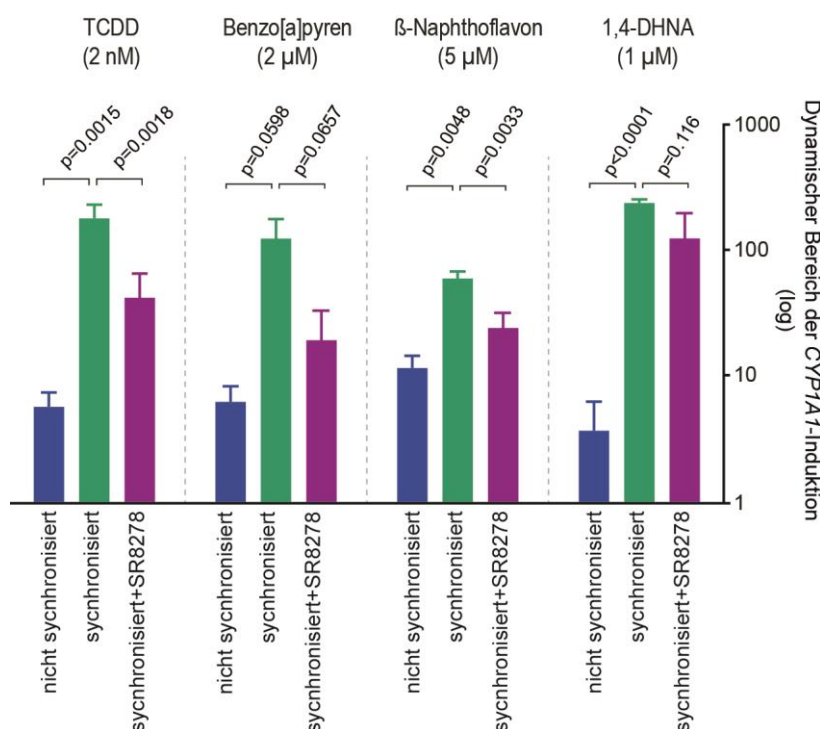
Nicht synchronisierte und synchronisierte HME1-Zellen wurden für 24 h mit steigenden Konzentrationen von (a) TCDD, (b) BaP, (c)  $\beta$ -NF und (d) 1,4-DHNA behandelt. Anschließend wurde die Expression von *CYP1A1* mittels qRT-PCR bestimmt und auf *B2M* normalisiert. Die gestrichelten Linien markieren den dynamischen Bereich des *CYP1A1*-Expressionslevels. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

Zur quantitativen Analyse des dynamischen Bereichs wurden die Expressionswerte bei maximaler Behandlung durch die der Kontrollbehandlung des jeweiligen Synchronisationsszenarios dividiert. Zusätzlich zum dynamischen Bereich in nicht synchronisierten und synchronisierten Zellen, wurde der dynamische Bereich für synchronisierte Zellen berechnet, die parallel zur Xenobiotika-Behandlung mit SR8278 behandelt wurden.

Der dynamische Bereich ist für alle vier Substanzen in den Zellen mit synchroner Phase im Vergleich zu den nicht synchronisierten Zellen signifikant vergrößert. Durch eine zusätzliche Behandlung der synchronisierten Zellen mit SR8278



reduzierte sich der erhöhte dynamische Bereich (Abbildung 22). Das unterstreicht den Einfluss der Synchronisierung auf die untersuchte Response.



**Abbildung 22: Erhöhter dynamischer Bereich der CYP1A1-Induktion in synchronisierten HME1-Zellen**

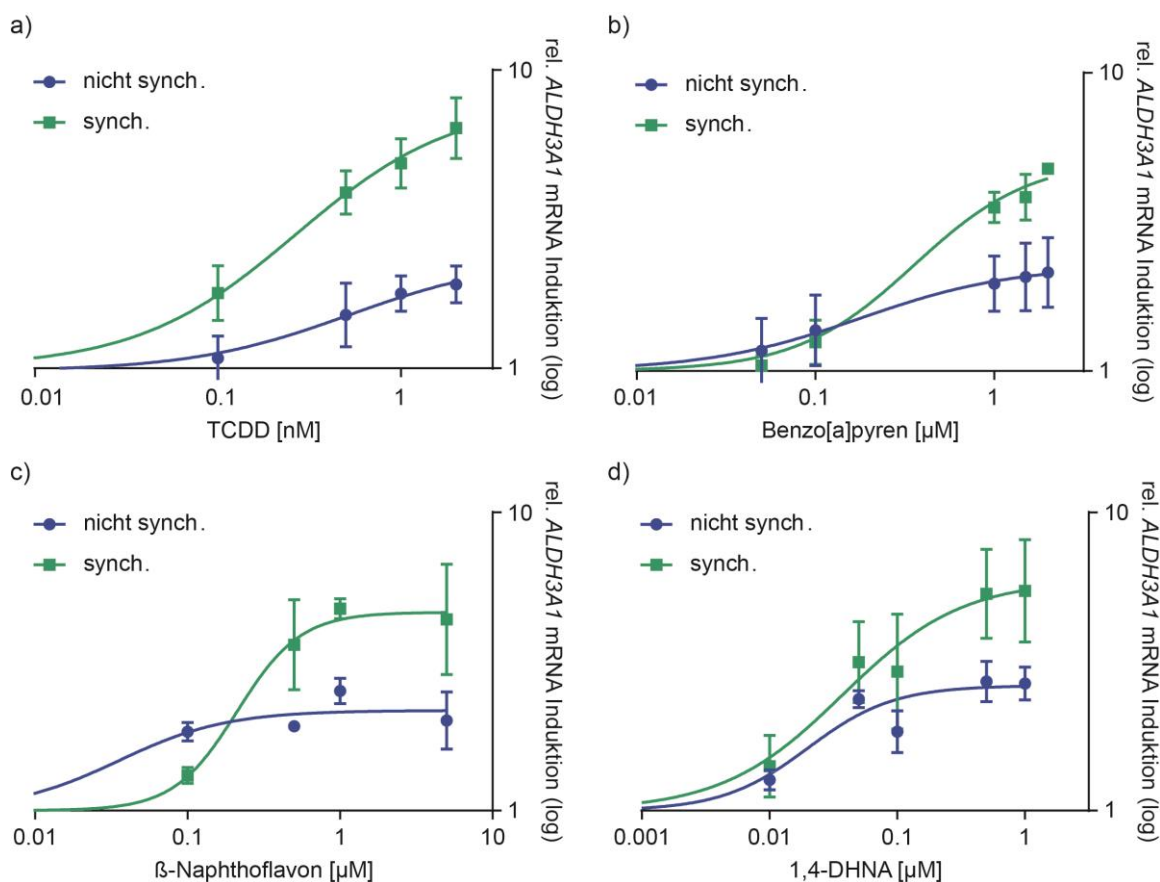
Die Berechnung des dynamischen Bereichs erfolgte durch eine Division der *CYP1A1*-Induktion bei maximaler Behandlung mit TCDD, BaP, β-NF oder 1,4-DHNA durch die Kontrollbehandlung. Aufgetragen sind die Ergebnisse für nicht synchronisierte und synchronisierte Zellen sowie für synchronisierte Zellen, die parallel mit 10 μM SR8278 behandelt wurden. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert ± Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente; p-Werte wurden anhand des Welch-Tests bestimmt.

### 3.3.2 Verifizierung der Ergebnisse mittels weiterer Zielgene

Um zu untersuchen, ob sich die Ergebnisse anhand von weiteren Zielgenen verifizieren lassen, wurden Microarray-Analysen von nicht synchronisierten und synchronisierten HME1-Zellen durchgeführt, die mit der Lösemittelkontrolle oder TCDD behandelt worden waren. Diese Analysen ergaben eine erhöhte Induktion der Aldehyd-Dehydrogenase 3A1 (*ALDH3A1*) in synchronisierten Zellen. *ALDH3A1* ist neben *CYP1A1* ein weiteres Zielgen im AHR-Signalweg und ebenfalls ein Enzym des Fremdstoffmetabolismus [252-254]. Infolgedessen wurde die Expression von *ALDH3A1* in Xenobiotika-behandelten HME1-Zellen mittels qRT-PCR-Analysen bestimmt.

### 3.3.2.1 Stärkere Induktion von *ALDH3A1* in synchronisierten Zellen

Entsprechend dem bisherigen Protokoll wurden nicht synchronisierte und synchronisierte HME1-Zellen für 24 h mit aufsteigenden Konzentrationen der vier zuvor verwendeten Xenobiotika behandelt und mittels qRT-PCR analysiert. Die Dosis-Wirkungskurven von *ALDH3A1* zeigten bei jeder Substanz denselben Verlauf wie bei *CYP1A1*, allerdings wurde *ALDH3A1* insgesamt schwächer induziert. Die maximale Behandlung erzeugte eine erhöhte Induktion in synchronisierten Zellen um einem Faktor von ~2 für BaP,  $\beta$ -NF und 1,4-DHNA (Abbildung 23 b-d) und eine Vervielfachung durch eine Behandlung mit TCDD (Abbildung 23 a).



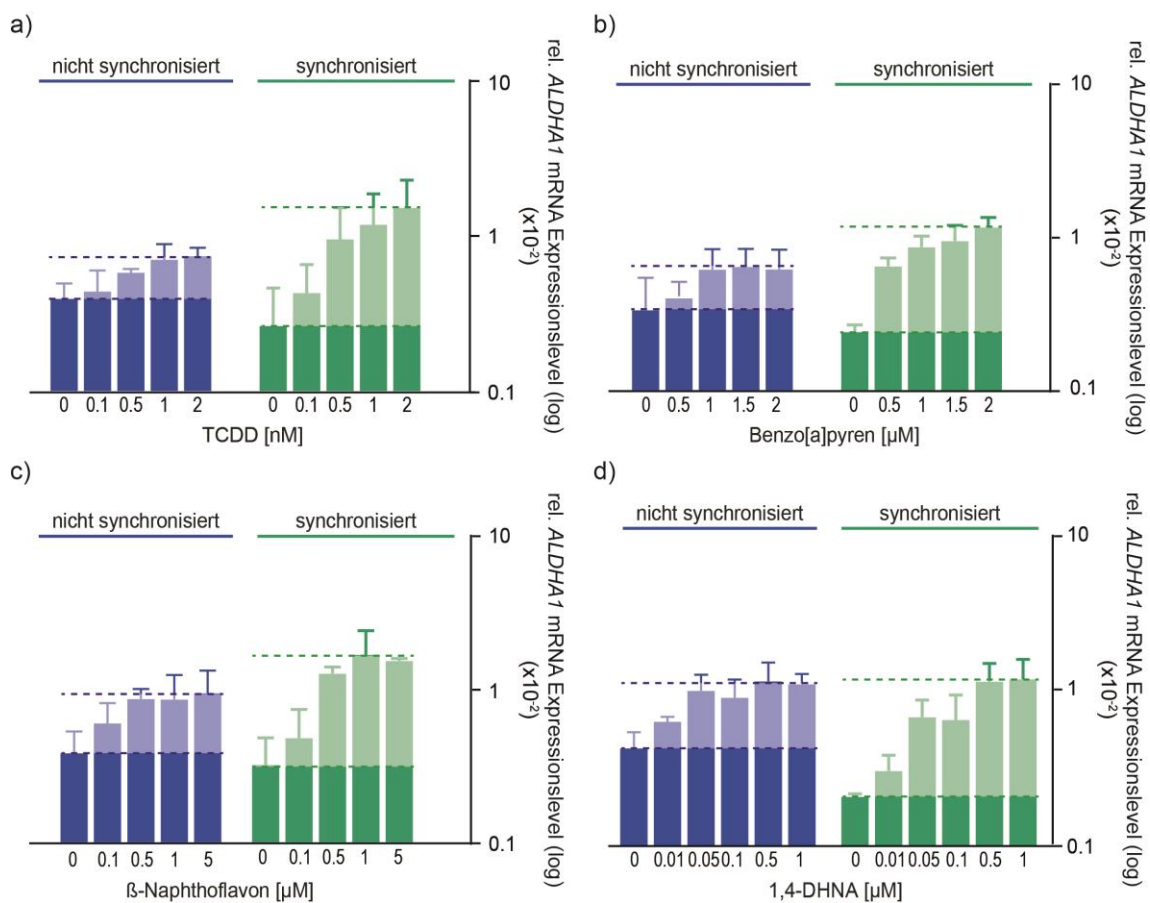
**Abbildung 23: Erhöhte *ALDH3A1*-Induktion durch circadiane Synchronisierung in HME1-Zellen**

Nicht synchronisierte und synchronisierte HME1-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von (a) TCDD, (b) BaP, (c)  $\beta$ -NF und (d) 1,4-DHNA behandelt. Anschließend wurde die Expression von *ALDH3A1* mittels qRT-PCR bestimmt und auf *B2M* und die interne Lösemittelkontrolle DMSO normalisiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

Die Beobachtung, dass ein Entrainment die Response auf AHR-aktivierende Substanzen erhöht, konnte also anhand eines weiteren Zielgens bestätigt werden.

### 3.3.2.2 Erhöhter dynamischer Bereich der *ALDH3A1*-Expression

Da die basale Genexpression von *CYP1A1* 24 h nach Synchronisierung im Vergleich zu nicht synchronisierten Zellen geringer war, wurde die basale Genexpression von *ALDH3A1* ebenfalls genauer untersucht. Vergleichbar zu *CYP1A1* ist die basale Genexpression von *ALDH3A1* in synchronisierten HME1-Zellen geringer als in nicht synchronisierten Zellen. Die Expression nach maximaler Behandlungsdosis liegt für TCDD, BaP und  $\beta$ -NF über der mRNA-Menge der nicht synchronisierten Zellen, bei 1,4-DHNA ist die maximale Expression nicht erhöht. Wie für die *CYP1A1*-Induktion geht daraus ein vergrößerter dynamischer Bereich hervor (Abbildung 24).



**Abbildung 24: *ALDH3A1*-Genexpression in HME1-Zellen nach Xenobiotika-Behandlung**

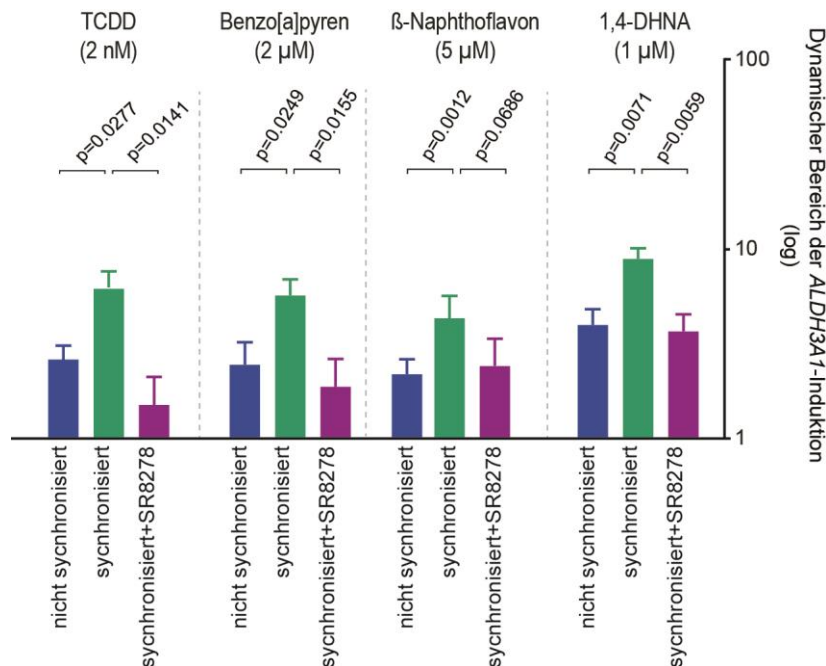
Nicht synchronisierte und synchronisierte HME1-Zellen wurden für 24 h mit steigenden Konzentrationen von (a) TCDD, (b) BaP, (c)  $\beta$ -NF und (d) 1,4-DHNA behandelt. Anschließend wurde die Expression von *ALDH3A1* mittels qRT-PCR bestimmt und auf *B2M* normalisiert. Die gestrichelten Linien markieren den dynamischen Bereich des *ALDH3A1*-Expressionslevels. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

Der dynamische Bereich wurde wie zuvor (s. 3.3.1.2) quantitativ analysiert, indem die Werte bei maximaler Substanzbehandlung durch die der Kontrollbehandlung des jeweiligen Synchronisationsszenarios dividiert wurden. Ebenfalls wurde zusätzlich

## Ergebnisse

der dynamische Bereich für synchronisierte Zellen berechnet, die parallel zur Xenobiotika-Behandlung mit SR8278 behandelt wurden.

Die Berechnungen ergaben eine signifikant erhöhte Induktion in synchronisierten Zellen sowie eine signifikante Dämpfung dieser erhöhten Induktion durch die Störung des Rhythmus durch SR8278 (Abbildung 25).



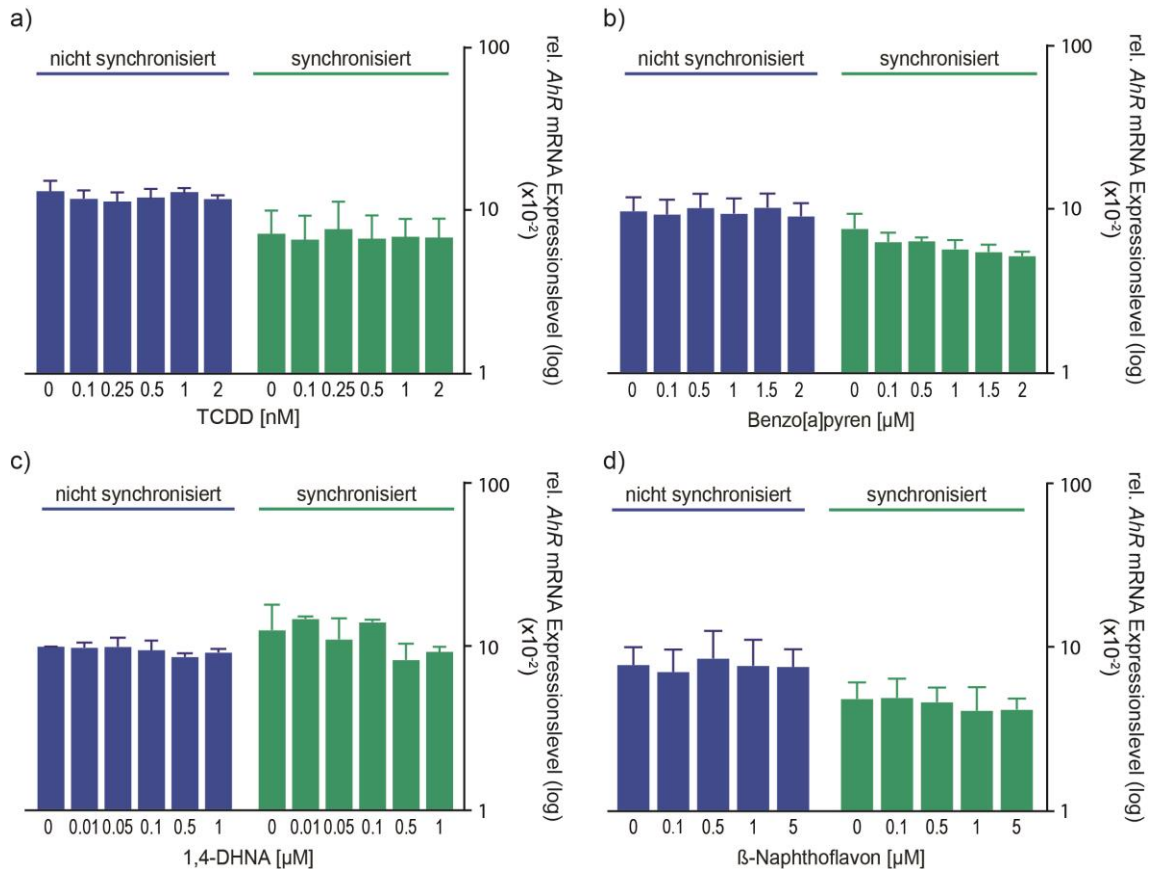
**Abbildung 25: Erhöhter dynamischer Bereich der *ALDH3A1*-Induktion in synchronisierten HME1-Zellen**

Die Berechnung des dynamischen Bereichs erfolgte durch eine Division der *ALDH3A1*-Expression bei maximaler Behandlung mit TCDD, BaP, β-NF oder 1,4-DHNA durch die Expression der Kontrollbehandlung. Aufgetragen sind die Ergebnisse für nicht synchronisierte und synchronisierte Zellen sowie für synchronisierte Zellen, die parallel mit 10 µM SR8278 behandelt wurden. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert ± Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente. p-Werte wurden anhand des Welch-Tests bestimmt.

### 3.3.3 Expressionsanalysen des *AHR* zeigen keine Beeinflussung im Testsystem

Die im Testsystem verwendeten Substanzen bewirken eine Translokation des AHR-Rezeptors in den Kern, der dort als Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor die untersuchten Gene (*CYP1A1* und *ALDH3A1*) induziert (Abbildung 3). Da gezeigt werden konnte, dass die Induktion der beiden Zielgene synchronisations-abhängig ist und der AHR in Nagern als circadian reguliert beschrieben wurde (s. 1.3.1.1), wurde nun mittels qRT-PCR untersucht, ob die Expression des *AHR* nach 24-stündiger Substanzbehandlung verändert ist.

Ausgenommen von leichten Varianzen in der Expression des Rezeptors, konnte bei keiner Substanz ein Effekt auf die *AHR*-Genexpression nach 24-stündiger Behandlung festgestellt werden, der die Unterschiede der Induktion der Zielgene erklären könnte. Ebenso wenig war das Basallevel in den synchronisierten Zellen nach 24 h verändert (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Relative Genexpression des *AHR* in HME1-Zellen nach Xenobiotika-Behandlung**

Nicht synchronisierte und synchronisierte HME1-Zellen wurden für 24 h mit steigenden Konzentrationen von (a) TCDD, (b) BaP, (c)  $\beta$ -NF und (d) 1,4-DHNA behandelt. Anschließend wurde die Expression des *AHR* mittels qRT-PCR bestimmt und auf *B2M* normalisiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

Die vergleichende Genexpressionsanalyse nicht synchronisierter und synchronisierter HME1-Zellen zeigte also keine Expressionsveränderungen des Rezeptors durch Xenobiotika-Behandlung oder Entrainment.

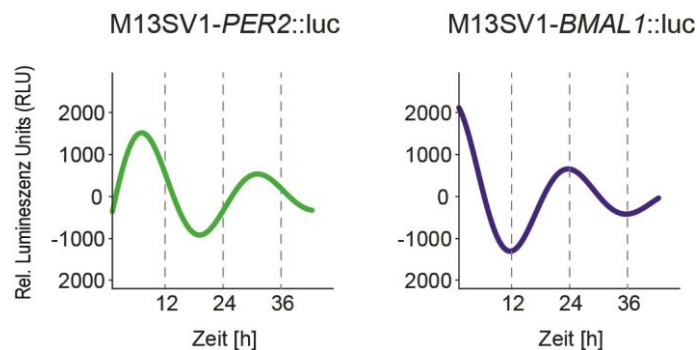
### 3.3.4 Verifizierung der verstärkten Response in weiteren Zelllinien

Um zu zeigen, dass die verstärkte transkriptionelle Response auf Xenobiotika durch Entrainment nicht nur in HME1-Zellen auftritt, wurden weitere - toxikologisch

relevante - Zelllinien entsprechend des etablierten Testsystems analysiert. Dies waren eine weitere Brustepithelzelllinie und zwei Darmkrebszelllinien. Damit sollte die Übertragbarkeit und biologische Relevanz der Ergebnisse für die Etablierung und Optimierung von *in vitro* Testsystemen für andere Zellen und vor allem andere Gewebetypen geprüft werden.

### 3.3.4.1 Verstärkte Response in M13SV1-Zellen

Zunächst sollte verifiziert werden, ob sich die erhöhte transkriptionelle Response in synchronisierten Zellen in einer Zelllinie des gleichen Gewebes wie die HME1-Zellen nachweisen lässt. Dazu wurde die humane Brustepithelzelllinie M13SV1 gewählt. Diese wurde transient mit den Luciferase-Reporterkonstrukten für *BMAL1* und *PER2* transfiziert und am Folgetag mit Dexamethason stimuliert, um zu überprüfen, ob diese Zellen synchronisierbar sind. Die anschließende Messung der Luciferaseaktivität über 36 h zeigte ein Entrainment des transienten Testsystems anhand einer anti-phasischen Oszillation des *PER2*- und *BMAL1*-Luciferase-Reporters (Abbildung 27), so dass diese Zellen für die Testung der Response auf AHR-Agonisten verwendet wurden.



**Abbildung 27: Reporterogenoszillation in M13SV1-Zellen**

Repräsentative, mittels der Software *Chronalyzer* gefittete Biolumineszenzkurven der mit PER2::luc und BMAL1::luc transient transfizierten M13SV1-Zelllinie, die mittels Dexamethason synchronisiert wurde.

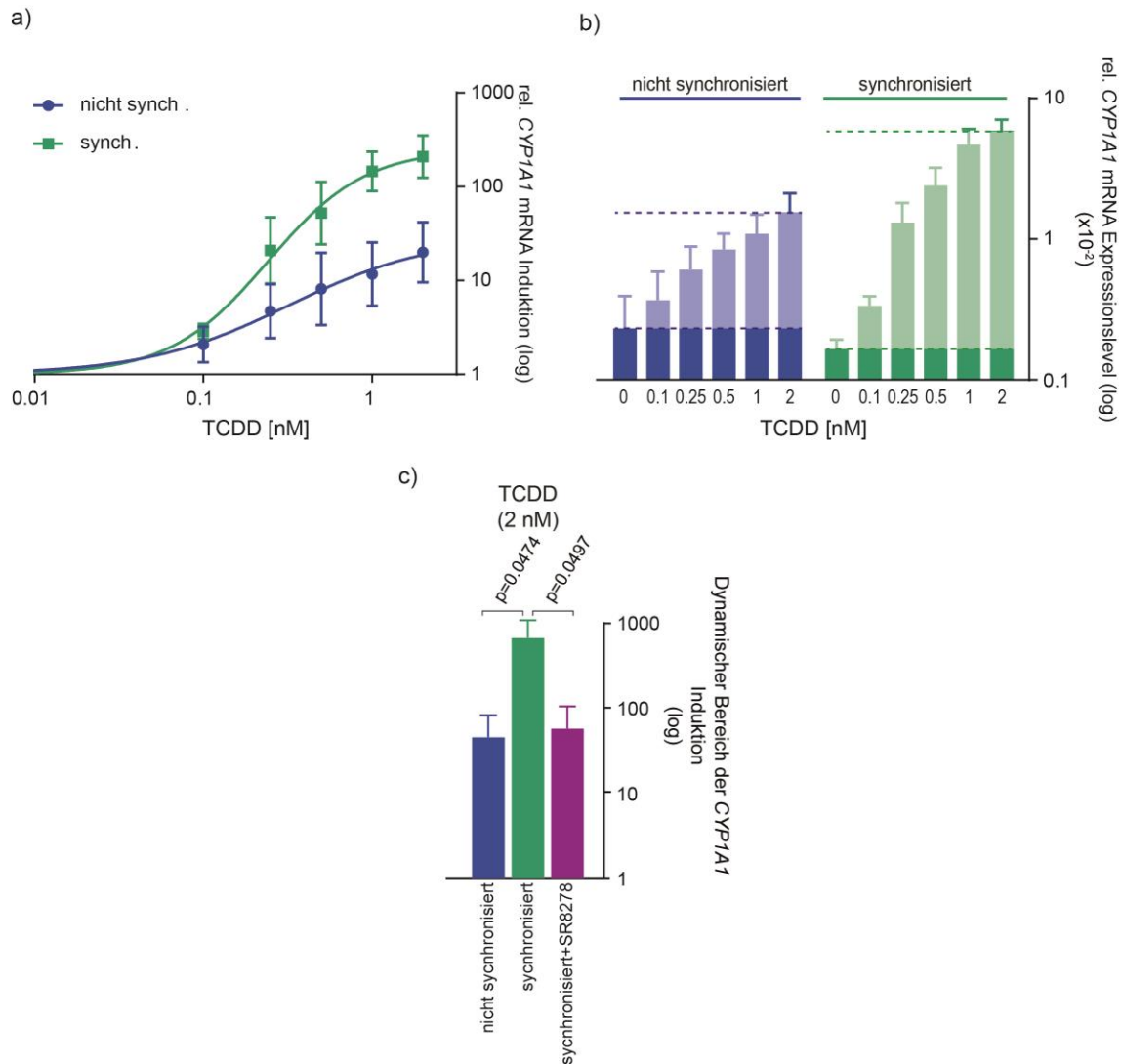
### Erhöhte CYP1A1-Induktion nach TCDD-Behandlung

Um nun zu testen, ob die Response der M13SV1-Zellen nach 24-stündiger Xenobiotika-Behandlung ebenfalls durch ein Entrainment erhöht ist, wurden nicht synchronisierte und mittels Dexamethason synchronisierte M13SV1 Zellen mit steigenden TCDD-Konzentrationen behandelt und anschließend mittels qRT-PCR auf die Genexpression von *CYP1A1* untersucht. Tatsächlich zeigte sich eine dosis-abhängige Induktion von *CYP1A1*, die in synchronisierten Zellen erhöht war (Abbildung 28 a). Das basale Expressionslevel von *CYP1A1* war 24 h nach Synchronisierung



## Ergebnisse

reduziert. Zugleich war die *CYP1A1*-Expression bei maximaler Behandlungsdosis im Vergleich zu nicht synchronisierten Zellen vervierfacht (Abbildung 28 b). Eine zur Maximaldosis parallele Behandlung mit dem REVERB $\alpha$ -Antagonisten SR8278, reduzierte den dynamischen Bereichs in synchronisierten Zellen auf das Niveau nicht synchronisierter Zellen (Abbildung 28 c).



**Abbildung 28: Erhöhte *CYP1A1*-Induktion durch Entrainment in TCDD-behandelten M13SV1-Zellen**

(a) Dosis-Wirkungskurve und (b) relatives Expressionslevel von *CYP1A1* nach TCDD-Behandlung. Nicht synchronisierte und synchronisierte M13SV1-Zellen wurden mit steigenden TCDD-Konzentrationen behandelt. Anschließend wurde die Expression von *CYP1A1* mittels qRT-PCR bestimmt und auf *B2M* (b) und die interne Lösemittelkontrolle DMSO (a) normalisiert. (c) Die Berechnung des dynamischen Bereichs erfolgte durch eine Division des *CYP1A1*-Expressionslevels bei maximaler Behandlungskonzentration durch die Basalexpression. Aufgetragen sind die Ergebnisse für nicht synchronisierte und synchronisierte Zellen sowie für synchronisierte Zellen, die parallel mit SR8278 behandelt wurden. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente. p-Werte wurden anhand des Welch-Tests bestimmt.

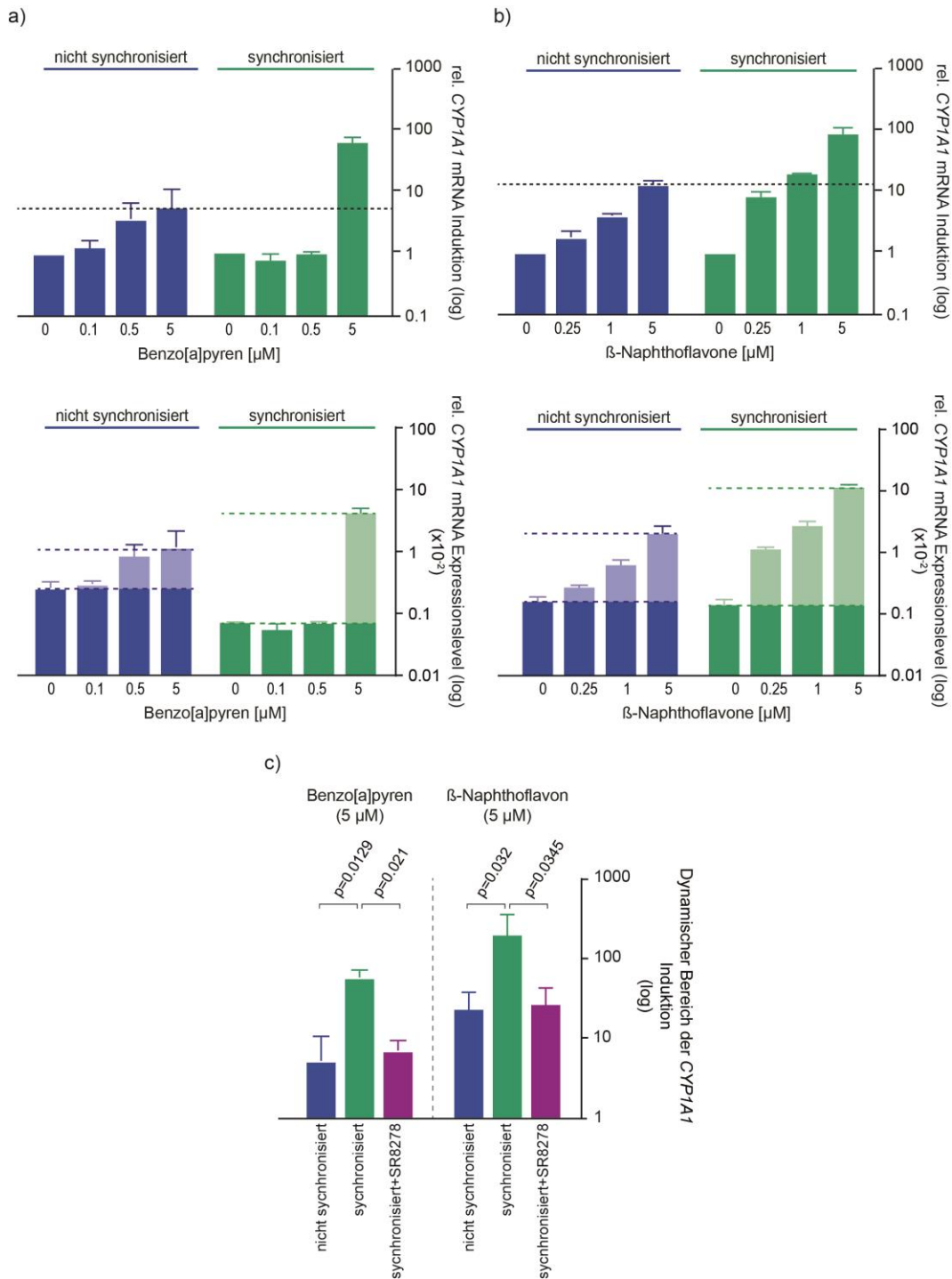
Eine 24-stündige TCDD-Behandlung nicht synchronisierter und synchronisierter M13SV1 Zellen zeigte also eine - mit den HME1-Zellen vergleichbare - erhöhte Induktion und einen erhöhten dynamischen Bereich von *CYP1A1* in synchronisierten Zellen, der durch eine Störung des circadianen Rhythmus verringert wurde.

### *Erhöhte CYP1A1-Induktion durch weitere Xenobiotika*

Um zu überprüfen, ob die erhöhte transkriptionelle Response auf TCDD in synchronisierten M13SV1 Zellen ebenfalls durch weitere Xenobiotika hervorgerufen wird, wurden nicht synchronisierte und synchronisierte M13SV1 Zellen mit steigenden Konzentrationen von BaP und  $\beta$ -NF behandelt. Daraufhin wurde die Expression von *CYP1A1* mittels qRT-PCR bestimmt. Dies zeigte eine signifikant verstärkte *CYP1A1*-Induktion in synchronisierten Zellen, der durch eine Störung des Rhythmus durch SR8278 auf das Niveau der nicht synchronisierten Zellen verringert wurde (Abbildung 29).



## Ergebnisse



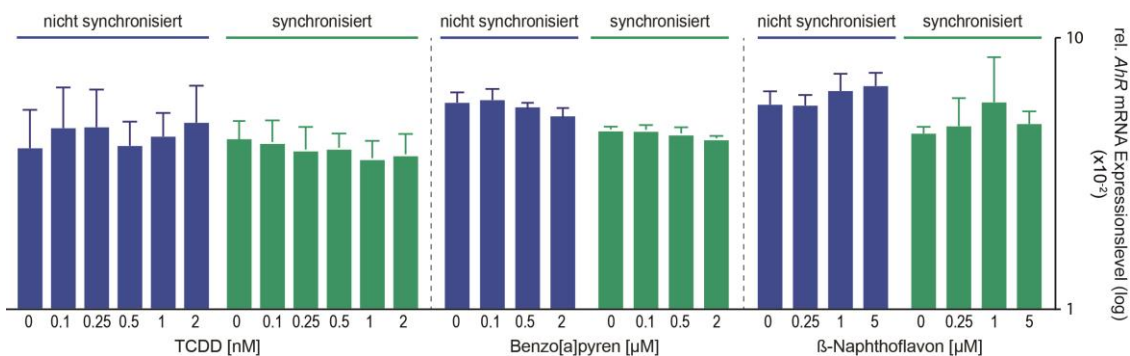
**Abbildung 29: Erhöhte *CYP1A1*-Induktion durch circadiane Synchronisierung in M13SV1-Zellen nach Behandlung mit weiteren Xenobiotika**

Relative Geninduktion (oben) und relatives Genexpressionslevel (unten) von *CYP1A1* in M13SV1-Zellen nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen von (a) BaP und (b)  $\beta$ -NF. (c) Die Berechnung des dynamischen Bereichs erfolgte durch eine Division der *CYP1A1*-Induktion bei maximaler Behandlungskonzentration durch die Basalexpression. Aufgetragen sind die Ergebnisse für nicht synchronisierte und synchronisierte Zellen sowie für synchronisierte Zellen, die parallel mit SR8278 behandelt wurden. Die *CYP1A1*-Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf *B2M* (a+b, unten) und die interne Lösemittelkontrolle DMSO (a+b, oben) normalisiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente; p-Werte wurden anhand des Welch-Tests bestimmt.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die durch Entrainment erhöhte *CYP1A1*-Induktion durch TCDD in M13SV1-Zellen ebenfalls durch weitere AHR-Agonisten bestätigt werden konnte.

### Expressionsanalysen des AHR in M13SV1-Zellen nach Xenobiotika-Behandlung

Die nach 24-stündiger Behandlung untersuchte Genexpression des *AHR* zeigte in HME1-Zellen keine Veränderung durch Xenobiotika oder Entrainment (Abbildung 26). Um nun zu prüfen, wie sich die Genexpression des *AHR* der M13SV1-Zellen verhält, wurde diese in nicht synchronisierten und synchronisierten M13SV1 Zellen mittels qRT-PCR analysiert. Die Xenobiotika-Behandlung erfolgte für 24 h mit steigenden Konzentrationen von TCDD, BaP und  $\beta$ -NF. Die Behandlung der Zellen bewirkte keine sichtbare Veränderung der *AHR*-Expression. Ebenso wenig war die Expression des Rezeptors 24 h nach Entrainment verändert (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Relative Genexpression des *AHR* in M13SV1-Zellen nach Xenobiotika-Behandlung**

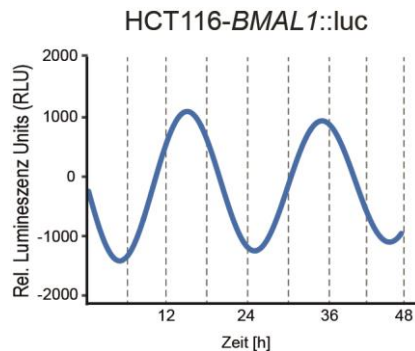
Nicht synchronisierte und synchronisierte M13SV1-Zellen wurden für 24 h mit steigenden Konzentrationen von TCDD, BaP,  $\beta$ -NF und 1,4-DHNA behandelt. Anschließend wurde die Expression des *AHR* mittels qRT-PCR bestimmt und auf *B2M* normalisiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

Die Analyse nicht synchronisierter und synchronisierter M13SV1-Zellen zeigte also keine Expressionsveränderungen des Rezeptors durch Xenobiotika-Behandlung oder Entrainment, so dass dies nicht die Ursache für die synchronisations-abhängige Induktion von *CYP1A1* sein kann.

### 3.3.4.2 Verstärkte transkriptionelle Response in circadian synchronisierten Darmkrebszellen

Da die bisherigen Ergebnisse in zwei Zelllinien des Brustgewebes gezeigt wurden, sollte nun ein anderes Gewebe auf die synchronisations-abhängige Induktion von AHR-Zielgenen durch Xenobiotika untersucht werden, um zu prüfen, inwieweit eine gewebe-spezifische Zellantwort vorliegt. Um die toxikologische Relevanz der

Ergebnisse zu verstärken, wurden dafür zwei Darmkrebszelllinien ausgewählt, da der Darm neben der Leber eines der wichtigsten Organe für den Fremdstoffmetabolismus ist [255]. Außerdem finden die gewählten Krebszelllinien HCT116 und Caco2 bereits Verwendung in toxikologischen Tests [256-258] und wurden als synchronisierbar beschrieben [209, 214]. Die Zelllinie HCT116 lag zudem bereits als circadiane Reporterzelllinie für *BMAL1* vor (Abbildung 31).

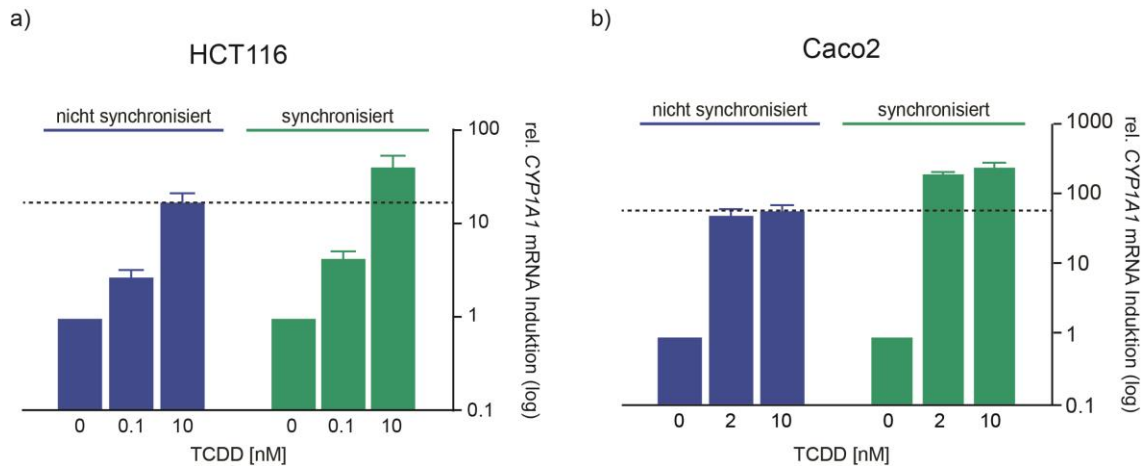


**Abbildung 31: Biolumineszenzkurve der circadianen HCT116-*BMAL1*-Reporterzelllinie**

Repräsentative, mittels der Software *Chronalyzer* gefittete Biolumineszenzkurve der HCT116-*BMAL1*-Reporterzelllinie nach Dexamethason-Entrainment.

### *Erhöhte CYP1A1-Induktion durch Entrainment in Darmkrebszelllinien*

Um zu untersuchen, ob die durch Entrainment erhöhte Response auf Xenobiotika ebenfalls in Darmkrebszellen nachzuweisen ist, wurden nicht synchronisierte und mit Dexamethason synchronisierte HCT116 und Caco2 Zellen für 24 h mit je zwei TCDD-Konzentrationen behandelt und mittels qRT-PCR auf ihre *CYP1A1*-Expression untersucht. Dabei zeigte sich eine deutlich erhöhte Induktion von *CYP1A1* durch TCDD nach Entrainment beider Zelllinien. Die Induktion bei maximaler Dosis war in beiden Zelllinien im Vergleich zu nicht synchronisierten Zellen ungefähr verdoppelt (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Erhöhte CYP1A1-Induktion durch Entrainment in Darmkrebszellen nach TCDD-Behandlung**

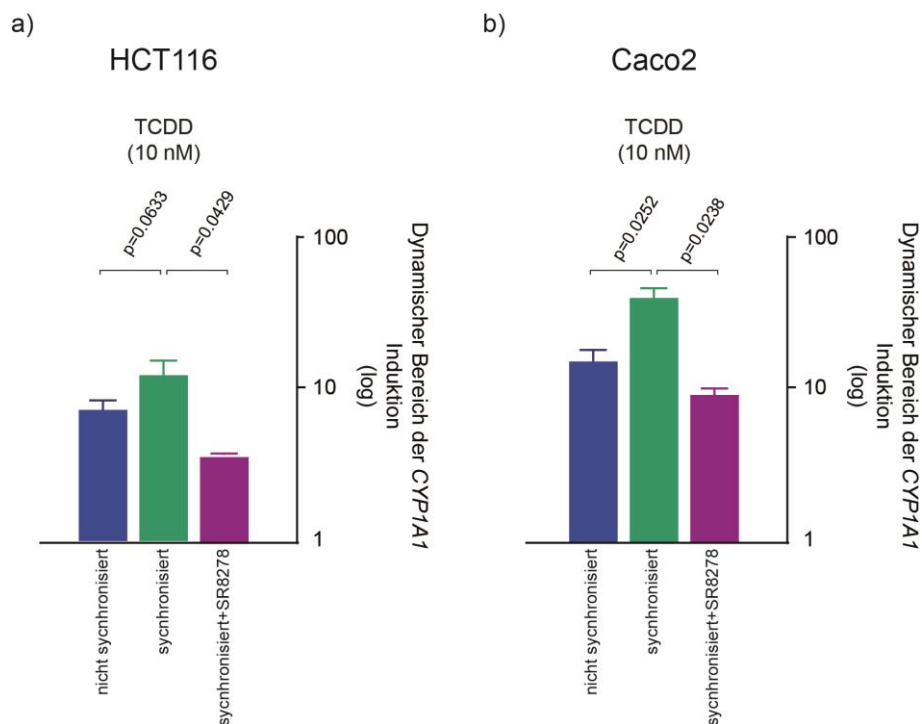
Nicht synchronisierte und synchronisierte (a) HCT116- und (b) Caco2-Zellen wurden mit steigenden TCDD-Konzentrationen behandelt. Anschließend wurde die Expression von *CYP1A1* mittels qRT-PCR bestimmt und auf *B2M* und die interne Lösemittelkontrolle DMSO normalisiert. Die Daten der HCT116-Zellen wurden von Dorothe Storm generiert (0). Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente. p-Werte wurden anhand des Welch-Tests bestimmt.

### 3.3.4.3 Vergrößerter dynamischer Bereich durch Entrainment

Die quantitative Analyse erfolgte anhand einer Division der Expressionswerte bei maximaler Behandlung durch die Expression bei der Lösemittelkontrolle des jeweiligen Synchronisationsszenarios. Zusätzlich zum dynamischen Bereich in nicht synchronisierten und synchronisierten Zellen, wurde der dynamische Bereich für synchronisierte Zellen berechnet, die parallel zur Xenobiotika-Behandlung mit SR8278 behandelt wurden.

Der dynamische Bereich ist in beiden Zelllinien, deren Phasen synchronisiert sind, im Vergleich zu nicht synchronisierten Zellen signifikant erhöht. Durch eine zusätzliche Behandlung der synchronisierten Zellen mit SR8278 reduziert sich der dynamische Bereich auf ein Level, das sich unter dem der nicht synchronisierten Zellen befindet (Abbildung 33).

Das zeigt, dass das Entrainment auch in den Darmkrebszelllinien zu einem erhöhten dynamischen Bereich nach TCDD-Behandlung führt.



**Abbildung 33: Erhöhter dynamischer Bereich in synchronisierten Darmkrebszellen nach TCDD-Behandlung**

Die Berechnung des dynamischen Bereichs erfolgte durch eine Division des *CYP1A1*-Expressionslevels bei maximaler Behandlungskonzentration durch die Expression bei der Kontrollbehandlung. Aufgetragen sind die Ergebnisse für nicht synchronisierte und synchronisierte (a) HCT116- bzw. (b) Caco2-Zellen sowie für synchronisierte Zellen, die parallel mit SR8278 behandelt wurden. Die Daten der HCT116-Zellen wurden von Dorothe Storm generiert (0). Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente; p-Werte wurden anhand des Welch-Tests bestimmt.

Dies bestätigt, dass ein Entrainment auch in anderen Zell- bzw. Gewebetypen zu einer erhöhten transkriptionellen Response führt und unterstreicht damit die Bedeutung des circadianen Rhythmus bei der Testung von Gefahrstoffen *in vitro*.

### 3.4 Entrainment erhöht die CYP1A1-Enzymaktivität nach TCDD-Behandlung

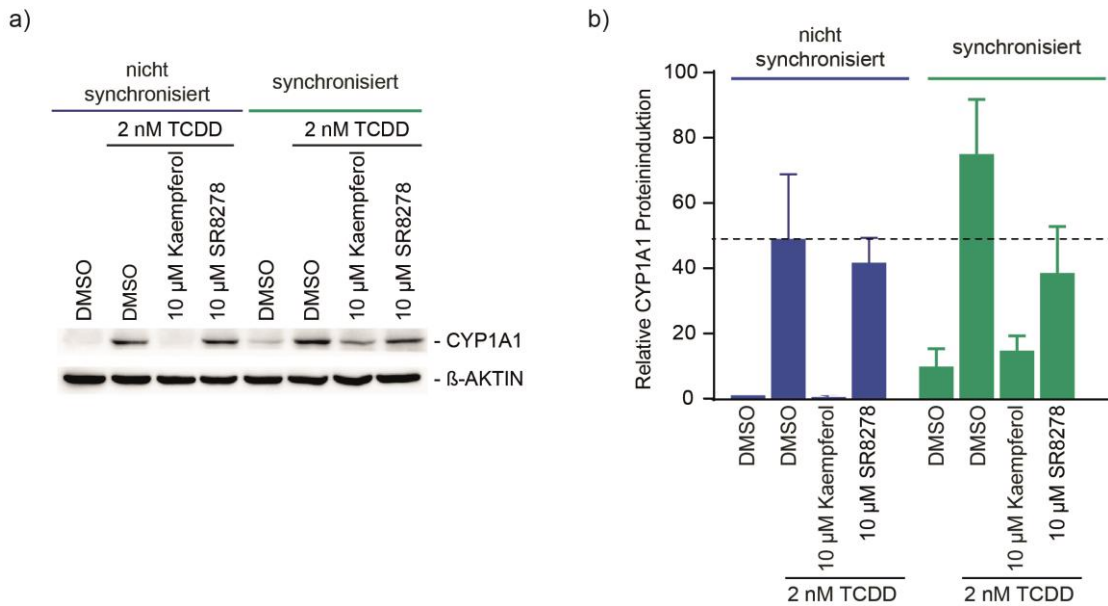
Nachdem nun anhand mehrerer Zelllinien verifiziert werden konnte, dass die Geninduktion von AHR-Zielgenen durch Xenobiotika durch ein Entrainment erhöht wird, sollte weiterführend untersucht werden, ob sich dies auch auf Proteinebene widerspiegelt. Eine erhöhte Geninduktion von *CYP1A1* durch TCDD muss nicht zwangsläufig zu einem Anstieg der Proteinmenge führen [259], so dass nicht unbedingt eine funktionelle Konsequenz gegeben ist. Daher sollte sowohl die Proteinmenge, als auch die Aktivität von *CYP1A1* in nicht synchronisierten und synchronisierten, TCDD-behandelten HME1-Zellen untersucht werden.

### 3.4.1 Erhöhte CYP1A1-Proteinmenge in synchronisierten Zellen

Zunächst wurde untersucht, ob sich die erhöhte mRNA-Menge in der Proteinmenge von CYP1A1 widerspiegelt. Dazu wurden nicht synchronisierte und synchronisierte HME1-Zellen für 24 h mit TCDD behandelt. Anschließend wurden Proteinlysate hergestellt und mittels Western Blot Analysen untersucht. Als Kontrolle, dass die Zellantwort AHR-vermittelt war, wurde Kaempferol eingesetzt; um den Einfluss des synchronen Rhythmus auf die Zellantwort zu kontrollieren, wurde ein Teil der Zellen parallel mit SR8278 behandelt.

Die Proteinmenge von CYP1A1 nach 24-stündiger TCDD-Behandlung war in synchronisierten Zellen im Vergleich zu nicht synchronisierten Zellen um ein 1,6-faches erhöht. Dies wurde in beiden Synchronisationsszenarien durch den AHR-Antagonisten Kaempferol auf das Niveau unbehandelter Zellen gesenkt. Dahingegen wirkte sich die Behandlung mit dem REVERB $\alpha$ -Antagonisten SR8278, der den homogenen Rhythmus der Zellen stört, ausschließlich hemmend auf die Proteinmenge der TCDD-behandelten, synchronisierten Zellen aus. Hier wurde die Proteinmenge auf das Niveau der nicht synchronisierten TCDD-behandelten Zellen gesenkt. Insgesamt war die Proteinmenge 24 h nach Entrainment weniger stark erhöht als die mRNA-Menge, die mRNA-Menge spiegelt daher nicht die quantitativen Veränderungen der Proteinmenge wider. Interessanterweise unterschied sich auch die basale Proteinmenge von CYP1A1 24 h nach Entrainment von der zuvor beobachteten mRNA-Menge. Während die mRNA-Menge in synchronisierten Zellen deutlich gesenkt war, zeigte sich Proteinmenge im Vergleich zu den nicht synchronisierten Zellen erhöht. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei der Transkription und der Translation um zeitversetzte, unterschiedlich regulierte Prozesse handelt, die in einer Momentaufnahme nicht unbedingt vergleichbare Level aufweisen (Abbildung 34).

Nichtsdestotrotz konnte die erhöhte transkriptionelle Response der synchronisierten Zellen auf der Ebene der Proteinmenge wiedergespiegelt werden. Außerdem zeigte die Parallelbehandlung mit SR8278, dass der Rhythmus der Zellen dabei eine ausschlaggebende Rolle spielte.



**Abbildung 34: Erhöhte CYP1A1-Proteinmenge synchronisierten HME1-Zellen nach TCDD-Behandlung**

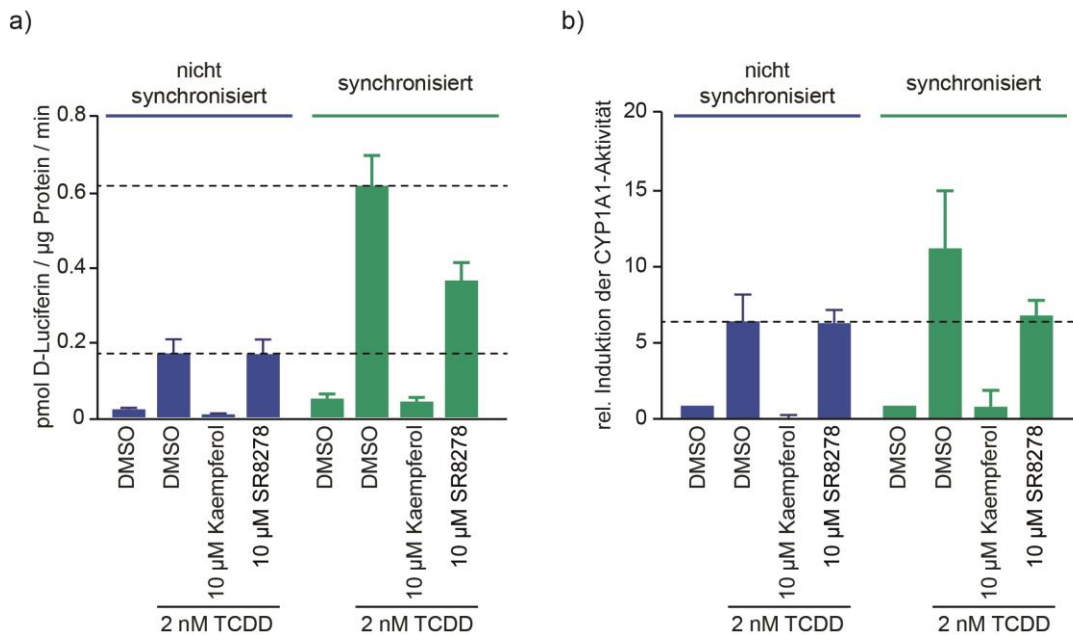
(a) Repräsentativer Western Blot von CYP1A1 in nicht synchronisierten und synchronisierten HME1-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 2 nM TCDD mit und ohne 10 μM Kaempferol bzw. 10 μM SR8278. (b) Quantifizierung dreier Western Blot Analysen von CYP1A1. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert ± Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

### 3.4.2 Erhöhte CYP1A1-Enzymaktivität durch Entrainment

Da nun gezeigt wurde, dass neben der mRNA- auch die Proteinmenge synchronisierter, TCDD-behandelter Zellen im Vergleich zu nicht synchronisierten Zellen erhöht ist, wurde nun geschaut, ob dies tatsächlich in eine erhöhte Funktionalität resultiert. Um dies zu untersuchen, wurde die Aktivität von CYP1A1 in dem Testsystem untersucht. Dazu wurden nicht synchronisierte und synchronisierte HME1-Zellen für 24 h mit TCDD oder der Lösemittelkontrolle behandelt und einem Lumineszenz-basierten, Substrat-spezifischen Enzymaktivitäts-Assay unterzogen (Abbildung 35). Als Kontrollsubstanzen wurden Kaempferol und SR8278 eingesetzt. Der Aktivitäts-Assay zeigte eine durch TCDD-Behandlung um den Faktor 6,5 erhöhte Enzymaktivität in nicht synchronisierten Zellen. In den behandelten, synchronisierten Zellen war die Enzymaktivität im Vergleich dazu verdoppelt. Die Inhibition der AHR-Aktivität durch eine Kaempferol-Behandlung verhinderte den TCDD-vermittelten Anstieg in beiden Szenarien. Der REVERBα-Antagonist SR8278 hingegen reduzierte spezifisch die Aktivität der behandelten, synchronisierten Zellen und bestätigte somit den Einfluss des Entrainments (Abbildung 35). Entsprechend der gemessenen Proteinmengen wurde ebenfalls ein erhöhtes Basallevel in den synchronisierten HME1-Zellen beobachtet, so dass die Aktivität das Proteinexpressionsmuster komplett abbildete.



## Ergebnisse



**Abbildung 35: Erhöhte CYP1A1-Enzymaktivität in TCDD-behandelten, synchronisierten HME1-Zellen**

(a) Enzymaktivitätsrate in pmol D-Luciferin/ µg Protein/ min nicht synchronisierter und synchronisierter TCDD-behandelter HME1-Zellen anhand eines Lumineszenz-basierten Substrat-Assays mit zusätzlicher Kaempferol- bzw. SR8278-Behandlung (b) Relative Induktion der Aktivität auf die jeweilige Lösemittelkontrolle DMSO normalisiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

Es konnte also gezeigt werden, dass die erhöhte transkriptionelle Response in synchronisierten Zellen tatsächlich eine erhöhte, funktionelle CYP-Aktivität hervorruft. Dies bestätigt zusätzlich die toxikologische Relevanz einer Implementierung des circadianen Rhythmus in *in vitro* Testsysteme.

### 3.5 Rhythmische Veränderungen der CYP1A1-Induktion

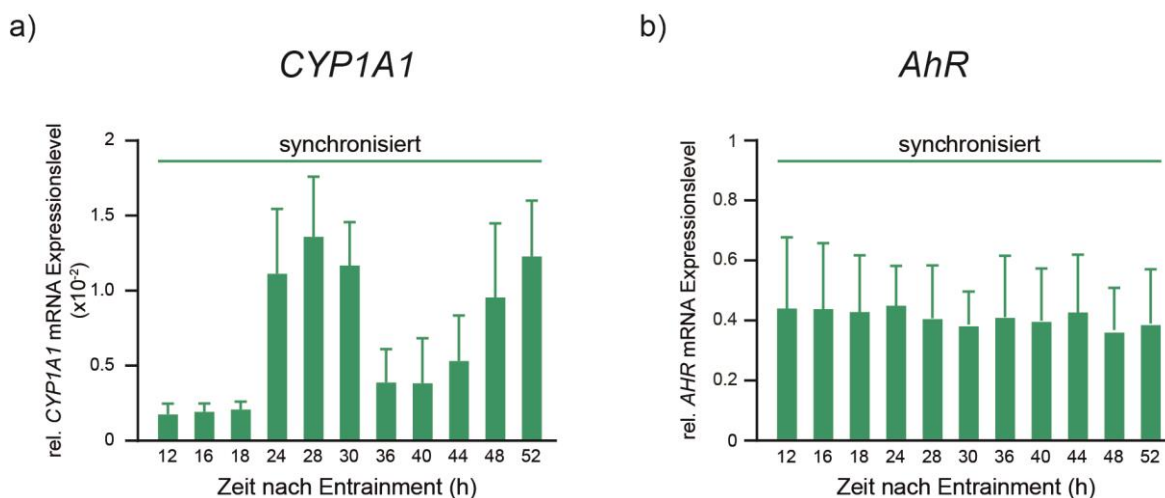
Nachdem nun gezeigt wurde, dass die Response der HME1-Zellen 24 h nach Entrainment sowohl auf Expressionsebene (mRNA und Protein) als auch auf funktioneller Ebene (Enzymaktivität) erhöht war, sollte untersucht werden, ob sich die Xenobiotika-vermittelte Response von der jeweiligen Phase des circadianen Rhythmus abhängt.

#### 3.5.1 Oszillation des basalen CYP1A1-Expressionslevels

Um eine potentielle Zeitabhängigkeit der Zellantwort auf Xenobiotika zu untersuchen, wurde zunächst das basale Expressionslevel des AHR und von CYP1A1 in synchronisierten Zellen HME1-Zellen bestimmt. Tatsächlich zeigte CYP1A1 eine deutlich oszillierende Basalexpression mit Minima bei 12-18 h und 36-40 h und Maxima



bei 24-30 h und 48-52 h nach Entrainment (Abbildung 36 a). Interessanterweise bewirkte das Entrainment der HME1-Zellen dagegen keine circadianen Muster in der *AHR*-Expression (Abbildung 36 b).

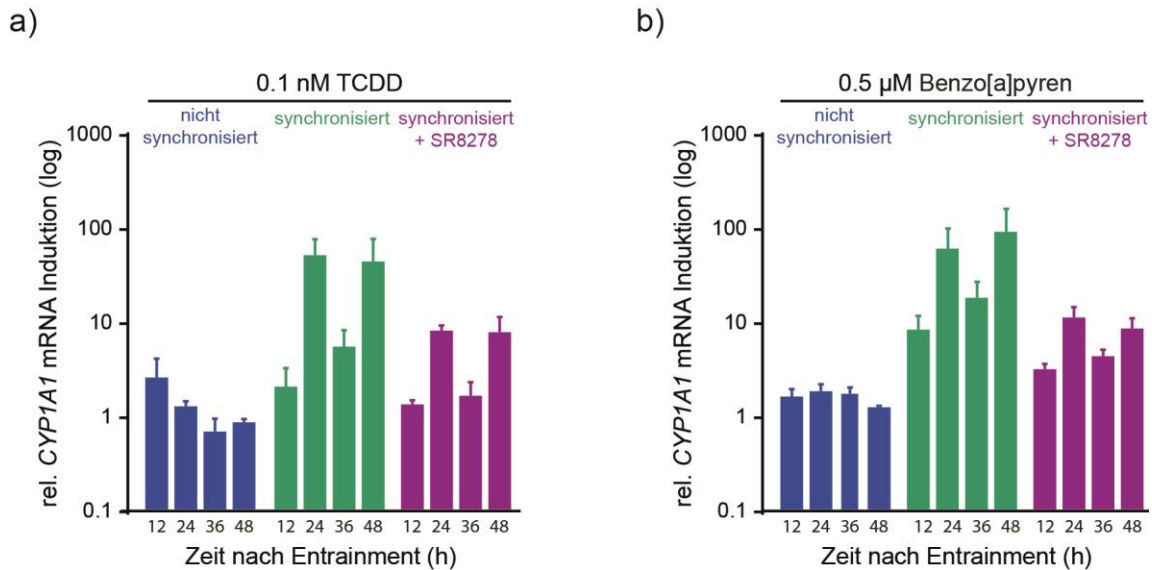


**Abbildung 36: Basale Expression von *CYP1A1* und dem *AHR* in synchronisierten HME1-Zellen**

Relatives *CYP1A1*-(a) und *AHR*-Expressionslevel (b) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Entrainment. Die Expression von *CYP1A1* und *AHR* wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf *B2M* normalisiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

### 3.5.2 Zeitabhängigkeit der *AHR*-vermittelten Zellantwort

Basierend auf den Ergebnissen der circadianen Basalexpression von *CYP1A1*, wurde nun die Zeitabhängigkeit der Xenobiotika-vermittelten Zellantwort der HME1-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen direkt nach dem Entrainment mit TCDD oder BaP behandelt und zu Zeitpunkten analysiert, in denen die Basalexpression von *CYP1A1* Minima (nach 12 und 36 h) oder Maxima aufwies (nach 24 und 48 h). Eine Behandlung mit 0.1 nM TCDD (Abbildung 37 a) und 0.5  $\mu$ M BaP (Abbildung 37 b) resultierte in eine maximale *CYP1A1*-Induktion nach 24 und 48 h und einer schwächeren Induktion nach 12 und 36 h in synchronisierten Zellen, während dieses Expressionsprofil in den nicht synchronisierten Zellen keine rhythmische Änderung aufwies. Eine Störung des Rhythmus durch eine zusätzliche Behandlung mit SR8278 führt in beiden Versuchsansätzen zu einer Dämpfung der Induktion (Abbildung 37).



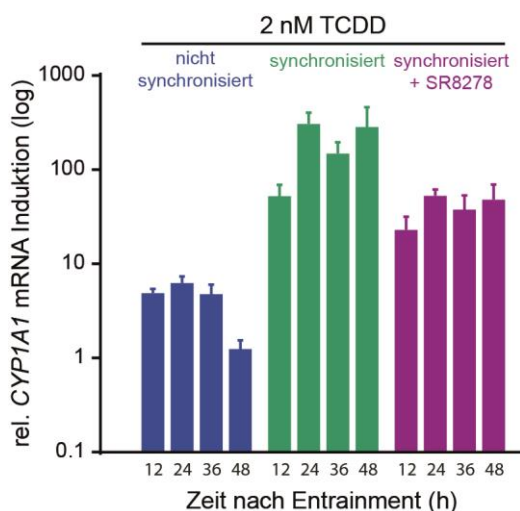
**Abbildung 37: Zeitpunktabhängigkeit der CYP1A1-Induktion in HME1-Zellen**

Nicht synchronisierte und synchronisierte Zellen wurden für 12, 24, 36 und 48 h mit 0,1 nM TCDD (a) oder 0,5 µM BaP behandelt. Anschließend wurde die CYP1A1-Expression mittels RT-qPCR bestimmt. Die Daten wurden auf B2M und die Lösemittelkontrolle des jeweiligen Synchronisationsszenarios normalisiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert ± Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

Somit konnte nachgewiesen werden, dass die CYP1A1-Induktion in synchronisierten HME1-Zellen zeitpunktabhängig ist.

### 3.5.3 Dosisabhängigkeit der circadianen Zellantwort

Um zu untersuchen, ob die ermittelte Zeitpunktabhängigkeit von der eingesetzten Dosis des Xenobiotikums beeinflusst wird, wurde der Versuch (s. 3.5.2) mit einer TCDD-Konzentration wiederholt, bei der das Plateau der Dosis-Wirkungskurve erreicht war (Abbildung 21). Tatsächlich unterscheidet sich das Ergebnis bei einer Behandlungsdosis von 2 nM TCDD von der Zellantwort bei geringer Konzentration. Die Maxima und Minima der CYP1A1-Induktion wurden zu denselben Zeitpunkten detektiert, allerdings waren die rhythmischen Unterschiede bei hoher Dosis weniger ausgeprägt als bei der niedrigen Dosis. Eine parallele Behandlung mit SR8278 reduzierte die CYP1A1-Induktion und verringerte die Induktionsunterschiede zwischen den verschiedenen Zeitpunkten (Abbildung 38).



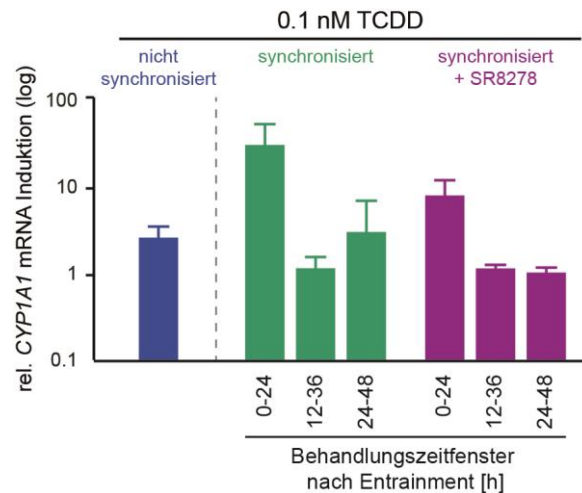
**Abbildung 38: Dosis-abhängige CYP1A1-Induktion nach Entrainment**

Nicht synchronisierte und synchronisierte Zellen wurden für 12, 24, 36 und 48 h mit 2 nM TCDD behandelt. Anschließend wurde die CYP1A1-Expression mittels RT-qPCR bestimmt. Die Daten wurden auf *B2M* und die Lösemittelkontrolle des jeweiligen Synchronisationsszenarios normalisiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

Der Einfluss circadianer Rhythmen auf die transkriptionelle Response ist daher nicht nur vom Zeitpunkt der Behandlung, sondern auch von der eingesetzten Dosis abhängig.

### 3.6 CYP1A1-Induktion ist phasenabhängig

Im vorherigen Kapitel (s. 3.5) wurde eine zeitpunkt- und dosis-abhängige Zellantwort in synchronisierten HME1-Zellen festgestellt. Dafür wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Behandlung analysiert. Da chronopharmakologische Studien gezeigt haben, dass der Zeitpunkt der Behandlung den Metabolismus eines Fremdstoffes signifikant beeinflussen kann (s. 1.3.2), wurde nun untersucht, ob hier ebenfalls eine Phasenabhängigkeit vorliegt. Dazu wurde das bisher analysierte 24-stündige Behandlungszeitfenster um 12 bzw. 24 h verschoben. Die maximale Induktion von CYP1A1 wurde in dem Behandlungszeitfenster von 0-24 h detektiert, gefolgt von 24-48 h; die schwächste Induktion wurde bei einem Behandlungszeitfenster von 12-36 h beobachtet. Die Störung des Rhythmus durch SR8278 reduzierte die Induktion, die ab dem Behandlungszeitfenster von 12-36 h auf minimalem Level verblieb. Im Vergleich zum Zeitpunkt 0-24 h war die CYP1A1-Induktion bei 24-48 h deutlich reduziert (Abbildung 39).



**Abbildung 39: Phasenabhängige CYP1A1-Induktion in HME1-Zellen nach Entrainment**

Relative *CYP1A1*-Induktion nicht synchronisierter und synchronisierter HME1-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 0.1 nM TCDD zu unterschiedlichen Behandlungszeitfenstern (0-24 h, 12-36 h, 24-48 h). Die Daten wurden auf *B2M* und die Lösemittelkontrolle des jeweiligen Synchronisationsszenarios normalisiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

Zusammengefasst manifestiert das circadiane *in vitro* Testsystem eine Abhängigkeit der Xenobiotika-vermittelten Response vom Zeitpunkt der Analyse sowie dem Behandlungszeitpunkt.

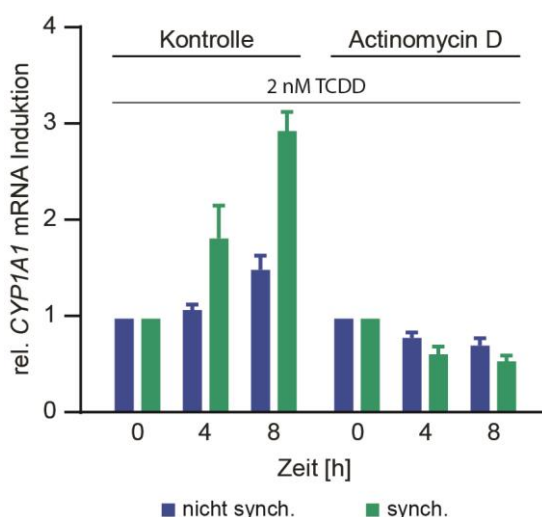
### 3.7 CYP1A1-Expressionsregulation in synchronisierten Zellen

Die rhythmus-abhängige Response in synchronisierten Zellen und die rhythmische Basalexpression von *CYP1A1* führt zu der Vermutung, dass die Regulation auf transkriptioneller Ebene von *CYP1A1* stattfindet, da die basale Expression des AHR keinen circadianen Rhythmus aufweist (Abbildung 36 b). Sowohl eine erhöhte mRNA-Stabilität als auch eine gesteigerte Transkription sind mögliche Ursachen für die erhöhte mRNA-Menge von *CYP1A1* in synchronisierten, TCDD-behandelten Zellen. Daher wurden initiale Messungen durchgeführt, die einen ersten Einblick in den zugrundeliegenden Mechanismus der veränderten Response durch Entrainment geben sollten.

#### 3.7.1 Veränderte mRNA-Stabilität von CYP1A1 ist nicht Ursache der gesteigerten Response

Zunächst wurde untersucht, ob sich die erhöhte mRNA-Menge von *CYP1A1* in TCDD-behandelten, synchronisierten Zellen auf eine erhöhte mRNA-Stabilität von *CYP1A1* zurückführen lässt. Dazu wurden nicht synchronisierte und synchronisierte HME1-Zellen für 16 h mit 2 nM TCDD behandelt, bevor der Transkriptioninhibitor

Actinomycin D bzw. die Lösemittelkontrolle DMSO für 4 bzw. 8 h hinzugegeben wurde. Die *CYP1A1*-Induktion der Kontroll-Zellen zeigte bereits nach 4 h eine im Vergleich zu den nicht synchronisierten Zellen erhöhte Induktion in synchronisierten Zellen, die sich nach 8 h verdoppelt hatte. Im Gegensatz dazu sank die *CYP1A1*-mRNA-Menge in den synchronisierten Zellen nach Zugabe von Actinomycin D geringfügig schneller als in den nicht synchronisierten Zellen (Abbildung 40).



**Abbildung 40: *CYP1A1*-mRNA-Stabilitätsmessung in nicht synchronisierten und synchronisierten HME1-Zellen nach TCDD-Behandlung**

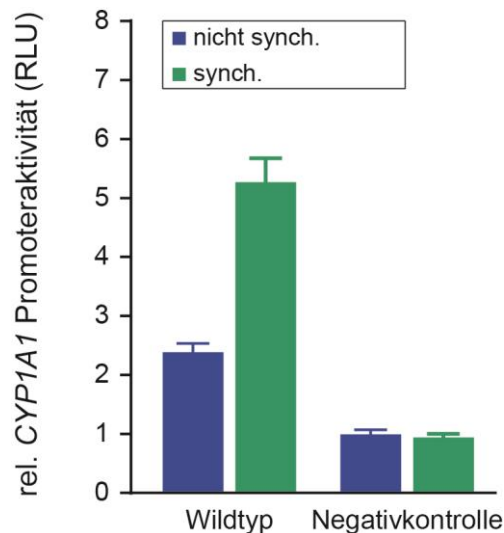
*CYP1A1*-Induktion nicht synchronisierter und synchronisierter HME1-Zellen nach 16-stündiger Behandlung mit 2 nM TCDD mit und ohne 4- bzw. 8-stündiger Folgebehandlung mit dem RNA-Syntheseinhibitor Actinomycin D. Die *CYP1A1*-Induktion wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf *B2M* und die Lösemittelkontrolle des jeweiligen Synchronisationsszenarios normalisiert. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Dorothe Storm und Norman Ertych generiert (0). Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

Die mRNA-Stabilität von *CYP1A1* ist zu dem Zeitpunkt der erhöhten mRNA-Menge also nicht erhöht und daher nicht die Ursache für die verstärkte Response.

### 3.7.2 Erhöhte *CYP1A1*-Promotoraktivität durch Zellsynchronisierung

Neben der Veränderung der mRNA-Stabilität könnte eine Regulation der *CYP1A1*-Promotoraktivität ursächlich für die veränderte Response in synchronisierten Zellen sein. Um also die Aktivität des *CYP1A1*-Promotors zu untersuchen, wurde diese mit Hilfe eines Luciferase-Reportersystems visualisiert. Dazu wurden M13SV1-Zellen transient mit einem Wildtyp-Promotor- bzw. einem mutierten, nicht AHR-induzierbaren Promotor-Luciferasekonstrukt (Negativkontrolle) transfiziert. Als Transfektionskontrolle wurde ein konstitutiv aktives Konstrukt der *Renilla*-Luciferase ko-transfiziert. Anschließend wurden nicht synchronisierte und synchronisierte Zellen für 24 h mit

TCDD behandelt. Daraufhin wurden die Zellen aufgeschlossen und mittels eines Dual-Luciferase-Assays gemessen. Zellen, die transient mit der mutierten Variante des *CYP1A1*-Promotors transfiziert worden waren, wiesen keine gesteigerte Promotoraktivität auf. Die mit dem Wildtyp-Konstrukt transfizierten, synchronisierten Zellen zeigten eine Verdopplung der Promotoraktivität im Vergleich zu nicht synchronisierten Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit TCDD.



**Abbildung 41: Erhöhte *CYP1A1*-Promotoraktivität in synchronisierten M13SV1-Zellen nach TCDD-Behandlung**

Biolumineszenzmessung transient transfizierter, nicht synchronisierter und synchronisierter, TCDD-behandelter M13SV1-Zellen, die entweder ein Wildtyp-Reporterkonstrukt oder eine mutierte Variante des *CYP1A1*-Promotors enthalten. Synchronisierte Zellen weisen eine Verdopplung der Promotoraktivität nach 24-stündiger Behandlung mit 2 nM TCDD auf. Die Biolumineszenz wurde auf eine co-transfizierte konstitutiv exprimierte *Renilla*-Luciferase normalisiert und die Promotoraktivität relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die abgebildeten Daten wurden von Norman Ertych generiert (0). Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

Das Entrainment der Zellen hatte also einen unmittelbaren Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität bei TCDD-Exposition, so dass bestätigt werden kann, dass die Wiederherstellung eines einheitlichen circadianen Rhythmus *in vitro* die Response eines Testsystems verstärken kann.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein circadianes *in vitro* Testsystem etabliert, anhand dessen die Hypothese überprüft wurde, ob eine Implementierung des circadianen Rhythmus die toxikologische Response eines Testsystems im Vergleich zu konventionellen Zellkultursystemen verändert.

Dazu wurde die humane Brustepithelzelllinie HME1 mithilfe eines chemischen Stimulus circadian synchronisiert und ihre Response auf AHR-aktivierende Xenobiotika mit nicht synchronisierten Zellen verglichen. Um die Übertragbarkeit auf andere Zelllinien und Gewebe zu belegen, wurden eine weitere humane Brustepithelzelllinie und zwei Darmkrebszelllinien analog untersucht.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten unterstützen die Arbeitshypothese, dass neben chronopharmakologischen auch chronotoxikologische Effekte *in vitro* nachgestellt werden können. Dabei zeigte sich, dass ein Zellentrainment zur Optimierung bestehender Testsysteme beitragen kann. Des Weiteren unterstreichen die anhand des Testsystems erhaltenen Ergebnisse die Relevanz des circadianen Rhythmus bei der Entwicklung neuer toxikologischer *in vitro* Testsysteme.

### 4.1 Etablierung eines circadianen *in vitro* Testsystems

Seit 1998 wurden zahlreiche *in vitro*-Zellmodelle zur Untersuchung des circadianen Rhythmus entwickelt. Dazu gehören unter anderem immortalisierte Ratten-[47] und Maus-Fibroblasten [260], humane Fibroblasten [219] und Osteosarkomazellen [214] sowie Keratinozyten [261] bis hin zu Organoiden [262]. Ziel dieser Arbeit war es, ein Zellmodell zu entwickeln, das zum einen synchronisierbar ist, d.h. dass die Phasen der einzelnen Zellen zueinander getaktet werden können, und zum anderen sollte der Einfluss des Entrainments auf die Zellantwort nach Xenobiotika-Behandlung untersucht werden.

#### 4.1.1 Visualisierung des circadianen Rhythmus

Für die Etablierung des circadianen *in vitro* Testsystems wurden Luciferase-Reporterzelllinien für *BMAL1* und *PER2* generiert (Abbildung 6), da diese Reportergensysteme häufig in der Chronobiologie verwendet werden [122, 214, 263, 264]. Die beiden Clockgene oszillieren anti-phasisch zueinander, so dass eine einfache initiale Kontrolle der Ergebnisse möglich ist. Außerdem kann eine Substanz-Behandlung unterschiedliche Effekte auf die einzelnen Clockgene haben, wie anhand von Leberanalysen mit dem Dioxin TCDD behandelte Mäuse festgestellt wurde [265].



Es ist also von Vorteil, Reportergensysteme mehrerer Clockgene zu verwenden, um ein Screening potentieller circadianer Disruptoren, also Substanzen, die den circadianen Rhythmus stören, durchzuführen.

Als möglicher Nachteil der Luciferase-basierten Reportergensysteme kann die sukzessive Abnahme der Amplitude gesehen werden (Abbildung 6). Da Luciferin bis zu einer Konzentration von 5 mM eingesetzt werden kann [217], ist es eher unwahrscheinlich, dass das Substrat in einer Messung über 72 h limitierend wirkt. Die tatsächliche Ursache für die Abnahme der Amplitude der Schwingung scheint in dem Verlust der Synchronität der Zellen zu liegen. Diese nimmt mit der Zeit ab, wenn kein erneuter Stimulus gegeben wird, so dass letztendlich jede Zelle wieder ihrem eigenen Rhythmus folgt [49-52]. Dies wurde zum Beispiel anhand von Messungen an Fluoreszenz-Reporterzellen gezeigt, die eine vergleichbare Reduktion der Amplitude aufwiesen [51]. Daraus ergibt sich eine Limitation des Testsystems bei dem Screening nach potentiellen circadianen Disruptoren. Circadiane Disruptoren, die erst nach einer dauerhaften Behandlung auf den Rhythmus wirken, könnten aufgrund der limitierten Dauer des Assays als falsch negative interpretiert werden. So konnte in dem hier entwickelten Testsystem z.B. gezeigt werden, dass der REVERB $\alpha$ -Antagonist SR8278 erst nach 28 h zu einem Erliegen der Luciferase-Reporter-Aktivität führt (Abbildung 17).

Um also falsch negative Ergebnisse, die auf eine verspätete Amplitudenabnahme durch bestimmte Substanzen zurückzuführen sind, zu vermeiden, sollten negative Ergebnisse zusätzlich verifiziert werden. Dies könnte umgesetzt werden, indem die Behandlung der Zellen mindestens 24 h vor dem Entrainment begonnen wird. Somit könnte zusätzlich gemessen werden, inwiefern eine bestimmte Substanz die Synchronisierbarkeit der Zellen beeinflusst.

### 4.1.2 Zell-Entrainment *in vitro*

Das Entrainment von Zellen *in vitro* ist mittels unterschiedlicher Methoden möglich [47, 54-56, 244, 245]. Diese muss dem Zelltyp und der Herkunft der Zelllinie angepasst werden. Vergleichende Studien zur Synchronisierbarkeit humaner Stammzellen verschiedener Herkunft haben z.B. gezeigt, dass Zellen des Knochenmarks eher auf chemische Reize reagieren, während Zellen der Zahnpulpa sich besser durch mechanische Reize synchronisieren lassen [266]. Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien HME1, M13SV1, HCT116 und Caco2 sind mittels unterschiedlicher chemischer Stimuli synchronisierbar [92, 189, 214, 267]. Dexamethason als künstliches Glucocorticoid, kommt dabei der physiologischen Situation am nächsten [55, 268] und wurde daher zum Entrainment der Zellen eingesetzt.



### 4.1.3 Optimierung des Testsystems

Das circadiane *in vitro* Testsystem sollte zur Testung potentiell humantoxischer Substanzen unter Berücksichtigung des circadianen Rhythmus eingesetzt werden. Erste Vorversuche zeigten eine erhöhte AHR-Aktivierung anhand einer *CYP1A1*-Induktion in synchronisierten Zellen nach 24-stündiger mit dem potenten AHR-Agonisten TCDD (Abbildung 11).

#### 4.1.3.1 Einfluss des Entrainment-Stimulus

Zunächst wurde ausgeschlossen, dass die Entrainmentmethode mit der Zellantwort interferiert [269], da verschiedene Effekte für Dexamethason beschrieben wurden [270-272]. Demnach wurde Dexamethason als Aktivator des Fremdstoffmetabolismus-Rezeptors PXR in Leberzellen der Ratte identifiziert [270], zur Differenzierung von murinen Adipocyten eingesetzt [271] und zeigte eine anti-inflammatorische Wirkung in der humanen Lunge [272]. Während also eine Analyse der PXR-Aktivität durch ein Dexamethason-Entrainment beeinflusst werden könnte, erscheint es weniger relevant für die Testung AHR-aktivierender Substanzen.

Allerdings zeigten weitere Studien, dass eine dauerhafte Dexamethason-Behandlung eine Wechselwirkung mit dem AHR hervorrufen kann [273-275]. So wurde eine Degradation des AHR und eine Reduktion der AHR-vermittelten *CYP1A1*-Induktion in der humanen, plazentalen JEG-3 Zelllinie festgestellt [274]. Außerdem wurde eine verminderte *CYP1A1*-Aktivität in humanen Hepatozyten [273] nach 24-stündiger Dexamethason-Behandlung gezeigt.

Im Gegensatz zu der beschriebenen Reduktion der AHR-Aktivität, zeigten die für eine Stunde mit Dexamethason behandelten HME1-Zellen in der vorliegenden Studie eine erhöhte Induktion von *CYP1A1* nach 24-stündiger TCDD-Behandlung. Dieser Effekt konnte zusätzlich durch die Anwendung von zwei alternativen Entrainment-Stimuli, bestätigt werden (Abbildung 13). Darüber hinaus zeigte eine einstündige Dexamethason-Behandlung nicht konfluenter, nicht gehungerter HME1-Zellen keinen Einfluss auf die Induktion von *CYP1A1* (Abbildung 15), so dass eine direkte Wirkung von Dexamethason als Ursache für die erhöhte Induktion in synchronisierten Zellen ausgeschlossen werden konnte.

#### 4.1.3.2 Einfluss der Zelldichte

Die Zelldichte ist neben dem Entrainment-Stimulus ein weiterer Faktor, der die unterschiedliche Response circadian synchronisierter Zellen im Vergleich zu nicht synchronisierten Zellen beeinflussen könnte. Tatsächlich wurde in einzelnen

Experimenten ein autonomes Entrainment der HME1-Zellen beobachtet, wenn sie eine Zelldichte von über 80% erreichten (Daten nicht gezeigt). Dies könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass die HME1-Zellen aufgrund ihrer Kontaktinhibition in den Zellzyklusarrest gehen. Da der Zellzyklus in Wechselwirkung mit dem circadianen Rhythmus steht [276, 277], könnte die Konfluenz und die darauffolgende Behandlung ausreichen, um ein gewisses Maß an Entrainment der Zellen zu bewirken. Eine andere Erklärung für das Stimulus-freie Entrainment konfluenter Zellen könnte auf einer Kommunikation zwischen den Zellen beruhen. Dies ist bereits für Zellen des SCN gezeigt worden [278, 279] und wird derzeit von der AG Kramer (Chronobiologie, Charité-Universitätsmedizin) für Zellen anderen Ursprungs untersucht. In der Folge musste die Zelldichte der nicht synchronisierten Zellen unter 80% betragen, um Dichtebedingte Artefakte des Zellkultursystems zu vermeiden.

### 4.1.3.3 Kontrolle der Synchronisationsabhängigkeit

Um eine Synchronisationsabhängigkeit der erhöhten Xenobiotika-vermittelten Response in synchronisierten Zellen nachzuweisen, war es notwendig, eine Methode zu ermitteln, die den Rhythmus der Zellen möglichst spezifisch inhibiert, ohne mit der Zellantwort zu interferieren. Eine mögliche Variante wäre die RNA-Interferenz mittels siRNA [280], um die Expression von Genen, die den circadianen Rhythmus regulieren, gezielt zu hemmen. Tatsächlich wurden fast 1000 siRNAs, die die Amplitude des circadianen Rhythmus reduzieren, in einem genom-weiten Screen identifiziert [281]. Allerdings war die Transfektionseffizienz der primär verwendeten HME1-Zelllinie gering, so dass im weiteren Verlauf Inhibitoren anstatt siRNA eingesetzt wurden, um mit der Clock-Maschinerie zu interferieren.

Eine häufig verwendete Substanz, die eingesetzt wird, um den circadianen Rhythmus zu stören, ist Leptomycin B (LMB), da es als Kernexport-Inhibitor dafür sorgt, dass die transkriptionellen/ translationalen Rückkopplungsschleifen unterbrochen werden [246, 247, 282-284]. Eine Leptomycin-Behandlung direkt nach dem Entrainment zeigte eine fast unmittelbare Desynchronisierung der Reporter-Zelllinien und eine Senkung der *CYP1A1*-Induktion um ca. 50% (Abbildung 16). Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Kernexport des AHR (s. 1.3.1.1) ebenfalls durch LMB beeinflusst wurde, da dieser eine Kernexportsequenz (NES) enthält und das Gleichgewicht des Import-Export-Shuttles die Aktivität des Rezeptors beeinflusst [249, 285]. Tatsächlich konnte in murinen und humanen Leberkrebszellen gezeigt werden, dass LMB den Abbau des AHR reduziert, indem es den Kernexport verhindert [166]. Folglich müsste die LMB-Behandlung zu einer Kernanreicherung des AHR und infolgedessen zu einer erhöhten Aktivierung des Rezeptors führen [285]. Die

50%-ige Reduktion der *CYP1A1*-Induktion könnte also tatsächlich auf die Störung des Rhythmus zurückzuführen sein. Andererseits könnten weitere reprimierende Faktoren involviert sein, die durch LMB am Export gehindert werden und daher zu einer reduzierten Aktivität des Rezeptors führen. Aufgrund dieser Wirkung von LMB auf den Kernexport aller Proteine mit NES [246-248], ist diese Substanz als Inhibitor nicht ausreichend spezifisch, um eine konkrete Aussage zu treffen.

SR8278 als Antagonist des Clockgens *REVERB $\alpha$*  hingegen wirkt spezifisch auf die Clock-Maschinerie, indem es *REVERB $\alpha$*  daran hindert, *BMAL1* zu inhibieren (Abbildung 1). Eine Behandlung circadian synchronisierter HME1-Zellen mit SR8278 führte interessanterweise zu einer zeitverzögerten Desynchronisierung der Reporterzellen nach ungefähr 28 h (Abbildung 17). SR8278 führt zu einer De-Regulation der dritten Rückkopplungsschleife, die den Rhythmus stabilisiert (s. 1.2.1), so dass er nach ca. 28 h zum Erliegen kommt. Dies spiegelt die signifikante Zeitverzögerung wieder, die für die Rückkopplungsschleifen der Clock-Maschinerie beschrieben ist [286]. Die zeitverzögerte Desynchronisierung erklärt auch, dass die Hemmung der *CYP1A1*-Induktion nach 24 h durch SR8278 in synchronisierten, Xenobiotika-behandelten HME1-Zellen nur partiell war (Abbildung 22).

Interessanterweise wurde beobachtet, dass die durch TCDD verursachte, erhöhte *CYP1A1*-Induktion sowohl in der Kontrolle als auch in SR8278-behandelten Zellen nach 48 h noch auf dem gleichen Niveau wie nach 24 h des jeweiligen Synchronisations-Szenarios war. Obwohl anhand der Rohdaten der SR8278-behandelten Lumineszenz-Reporterzellen nach 48 h kein Rhythmus mehr nachgewiesen werden konnte (Abbildung 18), schien die TCDD-Behandlung für eine erhöhte Induktion von *CYP1A1* auszureichen, wenn die Behandlung direkt nach dem Entrainment stattfand (Abbildung 37). Im Gegensatz dazu zeigte sich eine schwächere Induktion beim Behandlungszeitfenster von 24 - 48 h, die durch die Parallelbehandlung mit dem Inhibitor vollständig aufgehoben wurde (Abbildung 39). Dies könnte auf eine verringerte Induktionskapazität der Zellen 24 h nach Entrainment hinweisen.

Ein genereller Effekt der SR8278-Behandlung auf den AHR-Signalweg konnte ausgeschlossen werden, da nicht synchronisierte Zellen durch SR8278 weder in ihrer mRNA-Expression (Abbildung 17) noch in ihrer Proteinmenge (Abbildung 34) oder ihrer Enzymaktivität (Abbildung 35) verändert waren. Die Response der Zellen konnte also als synchronisations-abhängig definiert werden, da sie ausschließlich in synchronisierten Zellen durch SR8278 reduziert wurde.

## 4.2 Testung AHR-aktivierender Xenobiotika an circadianem *in vitro* Testsystem

Anhand des in dieser Arbeit etablierten circadianen *in vitro* Testsystems sollte zunächst untersucht werden, inwieweit die Agonisten des AHR den circadianen Rhythmus der HME1-Zellen beeinflussen. Bei nicht nachweisbarem Einfluss, sollte im Anschluss die Response circadian synchronisierter Zellen mit der von nicht synchronisierten verglichen werden, um zu ermitteln, ob das Zellentrainment eine sensitivere Zellantwort hervorruft.

### 4.2.1 AHR-Agonisten beeinflussen nicht die Oszillation der Biolumineszenz-Reporter-Zelllinien

Die Untersuchung des Effekts der Substanzen auf den circadianen Rhythmus der HME1-Zellen wurde mit Hilfe der Luciferase-Reporterzelllinien unternommen. Dabei zeigte sich, dass weder die *PER2*- noch die *BMAL1*-Reporter-Oszillation durch die Behandlung mit AHR-Agonisten beeinflusst wurde. Dies steht im Widerspruch zu vorherigen Studien an der Maus, die gezeigt haben, dass AHR-aktivierende Substanzen auf den circadianen Rhythmus einwirken können [172, 173]. So wurde in einem Jetlag-Modell der Maus gezeigt, dass eine einmalige TCDD-Exposition die Phasenanpassung nach Lichtstimulus reduziert und die Expression von *Per1* und *Bmal1* verändert [173]. Übereinstimmend zum Jetlag-Modell wurde eine Reduktion der *Per1*-Expression in murinen Leberkrebszellen durch Ahr-Aktivierung mittels einmaliger TCDD- und  $\beta$ -NF-Behandlung festgestellt [172]. Außerdem bewirkte eine einmalige Behandlung mit TCDD eine Veränderung der *Per1*- und *Per2*-Expression in murinen Knochenmarkzellen [287] und der *Bmal1* und *Per2*-Expression in Mausovarien [171]. Eine 28-Tage-Studie an Mäusen, denen alle vier Tage TCDD oral verabreicht wurde, zeigte ebenfalls eine Beeinträchtigung der Oszillation einiger der Clockgene, darunter *Per1*, *Per2* und *Bmal1*. Allerdings zeigte sich nur für *Per1* ein kompletter Verlust des Rhythmus, während *Per2* und *Bmal1* rhythmische Oszillationen mit verringerter Amplitude zeigten [265]. Jedoch konnte in einer Studie an Gewebeexplantaten von *Per2::luc*-Mäusen keine Veränderung der Amplitude, Periode oder Phase der Reporterogen-Oszillation durch TCDD festgestellt werden [288].

Die ausbleibende Beeinträchtigung der *PER2*-Reporterogen-Oszillation durch AHR-aktivierende Substanzen, die auch in dem hier untersuchten circadianen *in vitro* Testsystem festgestellt wurde, könnte darauf zurückzuführen sein, dass vorwiegend *PER1* durch die Behandlung betroffen ist. Da die *BMAL1*-Reporterzelllinie ebenfalls keine Veränderung der Oszillation zeigt, ist es möglich, dass diese Analyse nicht

sensitiv genug ist, um eine Amplitudensenkung durch AHR-Agonisten zu detektieren. Neben Spezies- und Zelltyp-spezifischen Unterschieden ist auch nicht auszuschließen, dass die Dauer und der Zeitpunkt der Behandlung für den fehlenden Einfluss auf den Rhythmus verantwortlich sind. An dieser Stelle ist es wichtig, weitere Untersuchungen durchzuführen, um zu ermitteln, ob eine chronische Substanz-Exposition der Zellen zu identischen Ergebnissen führt. Dies würde die Relevanz der Ergebnisse des Testsystems erhöhen, da Dioxine und Dioxin-ähnliche Stoffe in geringen Mengen, aber ubiquitär, in der Umwelt vorkommen und daher eine chronische Exposition des Menschen vorliegt [240]. Außerdem sollte zukünftig untersucht werden, ob der Zeitpunkt der Behandlung einen Einfluss auf die Reporter-Gen-Oszillation hat. Dies ist von besonderem Interesse für die Gefährdungseinstufung bei Schichtarbeiter\*innen, welche eine Phasenverschiebung in ihrem Rhythmus aufweisen können, so dass die Sensitivität gegenüber Xenobiotika erhöht sein kann, wie es in den Jetlag-Studien an Mäusen gezeigt wurde [173].

### 4.2.2 Entrainment erhöht Response auf Xenobiotika

Zur Untersuchung der Response auf AHR-Agonisten wurden circadian synchronisierte mit nicht synchronisierten Zellen verglichen. Dabei zeigte sich, dass die circadiane Synchronisierung der HME1-Zellen mittels Dexamethason zu einer deutlich erhöhten Response auf AHR-aktivierende Xenobiotika aus verschiedenen Substanzklassen führte. Diese konnte anhand von einem vergrößerten dynamischen Bereich der Geninduktion des Zielgens *CYP1A1* (Abbildung 22) und *ALDH3A1* (Abbildung 25) nach 24-stündiger Behandlung nachgewiesen werden. Eine Disruption des circadianen Rhythmus durch einen Antagonisten des Clockgens *REVERB $\alpha$*  führte zu einer Verminderung der Induktion in synchronisierten aber nicht in unsynchronisierten Zellen (Abbildung 17). Dies bestätigt, dass die erhöhte transkriptionelle Response in direktem Zusammenhang mit dem Zellentainment steht. Die Ergebnisse konnten des Weiteren auf Proteinexpressions- und vor allem auf Enzymaktivitätslevel von *CYP1A1* bestätigt werden (Abbildung 35), so dass eine physiologische Relevanz des Testsystems gegeben war. Tatsächlich ist die funktionelle Induktion der Enzymaktivität von CYPs ein aussagekräftigerer Endpunkt, als die Induktion der mRNA [289], da letztere nicht immer mit der Aktivität korreliert [290, 291]. So können Substanzen *CYP*-mRNA induzieren, ohne dass die Aktivität des Enzyms erhöht ist [290]. Andersherum zeigten Studien, dass die Enzymaktivität von CYPs Substanz-abhängig induziert werden kann, ohne dass das mRNA-Level beeinflusst wird [291]. Die Detektion einer erhöhten *CYP1A1*-Enzymaktivität in TCDD-

behandelten, synchronisierten Zellen unterstreicht also die Relevanz des in dieser Arbeit etablierten circadianen *in vitro* Testsystems.

Tageszeitabhängige Fluktuationen der Aktivität Fremdstoff-metabolisierender Enzyme der Leber wurden bereits in den 60er Jahren in der Ratte nachgewiesen [292, 293]. Dabei konnten konkrete Zusammenhänge mit dem circadianen Rhythmus hergestellt werden. Zum einen führte die Tierhaltung in konstanter Dunkelheit oder konstantem Licht zu einem veränderten Lebermetabolismus [293], zum anderen resultierte eine Adrenalectomie bzw. ein konstant gehaltenes Level des Glucocorticoids Corticosteron zu einer Störung des Fremdstoffmetabolismus [292]. In folgenden Studien wurden Rhythmus-abhängige Aktivitäten von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus auch in extrahepatischen Geweben dokumentiert. Unter anderem konnte eine circadian oszillierende Aktivität von Enzymen der Cytochrom-P450-Familie im Darm und der Lunge von Kaninchen nachgewiesen werden [176]. Das zeigt, dass sich der Fremdstoffmetabolismus und seine circadiane Regulation nicht auf Leberzellen beschränken. Tatsächlich belegen auch andere *in vitro*-Studien, dass sich Brustepithelzellen (MCF7, MCF-10A) zum Induktions-Nachweis der CYP-Aktivität eignen [135].

Anhand des in dieser Studie entwickelten circadianen *in vitro* Testsystems konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Experimente eine Zeitabhängigkeit in der transkriptionellen Response aufweisen. Sowohl der Zeitpunkt der Analyse (Abbildung 37) als auch das Behandlungszeitfenster bzw. die circadiane Phase (Abbildung 39) zeigten einen deutlichen Einfluss auf die CYP-Induktion. Dies wird durch mehrere Veröffentlichungen bestätigt [294-296]. So zeigten *in vivo*-Experimente, dass eine TCDD-Behandlung von Mäusen eine erhöhte *Cyp1a1*-Induktion in Leber und Milchdrüse hervorruft, wenn die Mäuse in der aktiven Phase exponiert wurden [294]. Übereinstimmend wurde eine tageszeit-abhängige Enzymaktivität von CYP1A1 nach BaP-Behandlung und die damit einhergehende DNA-BaP-Addukt-Bildung im Milchdrüsengewebe der Maus und in humanen Brustepithelzellen (MCF7/10A) publiziert [296]. Tanimura et al. (2011) gehen einen Schritt weiter und postulieren einen direkten molekularen Link zwischen dem circadianen Rhythmus und der Detoxifikation von Xenobiotika. Sie beschreiben das Clock-Protein als mögliches Bindeglied, das die circadiane Expression und damit die Aktivität des Ahr in der Mausleber beeinflusst [295].

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass eine Implementierung des circadianen Rhythmus in *in vitro* Testsysteme die Auswahl eines optimalen Analysezeitpunktes zulässt, um eine maximale Sensitivität der Response zu erzielen.



Außerdem zeigt die Zeitabhängigkeit der Zellresponse, dass es essentiell ist, mehrere Zeitpunkte zu testen, um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden.

### 4.2.2.1 Spezies-, Gewebe- und Zelltyp-spezifische Unterschiede der AHR-Aktivität

Im Widerspruch zur circadianen Expression im Nager, zeigt das hier etablierte circadiane *in vitro* Testsystem eine Zeitpunkt-abhängige, Xenobiotika-vermittelte Induktion und Aktivität von CYP1A1, die offenbar nicht von der Expression des AHR abhängt. Während verschiedene Maus- [173, 297] und Rattenstudien [174, 175] circadiane Oszillationen des *Ahr* und seines Zielgens *Cyp1a1* gezeigt haben, konnte in den HME1-Zellen keine rhythmische Expression der AHR-mRNA nachgewiesen werden (Abbildung 36). Eine mögliche Erklärung hierfür könnten spezies-spezifische Unterschiede sein, wie sie anhand von Genexpressionsanalysen in Maus, Ratte und humanen Lymphozyten gezeigt wurden, die mit TCDD behandelt worden waren [298]. Eine weitere Erklärung dafür könnte eine Gewebe-Spezifität der AHR-Oszillation sein. Während z.B. das Proteinlevel des *Ahr* in der Ratte ein circadianes Muster in Leber, Lunge und Thymus aufweist, konnte dieses nicht in der Milz nachgewiesen werden [175]. Außerdem zeigten Experimente an drei humanen Zelllinien, die von verschiedenen Geweben abstammen (Lunge, Leber, Blase), große Unterschiede in der Zellantwort auf eine BaP-Behandlung [299]. Dies konnte in dieser Arbeit anhand der Darmkrebs-Zelllinien HCT116 und Caco2 bestätigt werden, die unterschiedliche Zellantworten zu den analysierten Brustepithelzelllinien HME1 und M13SV1 nach TCDD-Behandlung zeigten (Abbildung 20, Abbildung 28, Abbildung 32).

Je nach Zelltyp können also unterschiedliche Zellantworten durch dieselbe Substanz ausgelöst werden. Daher ist es essentiell, Testsysteme zu optimieren, um sie dem verwendeten Zelltyp bzw. Gewebe anzupassen. Zum Beispiel kann CYP1B1 für einige Brustepithelzellen mit mesenchymaler Morphologie ein geeigneteres Read-Out sein, als CYP1A1 [300].

### 4.2.2.2 Erhöhte Sensitivität des circadianen *in vitro* Testsystems

Der AHR – als ein wichtiger Fremdstoffmetabolismus-Rezeptor – weist also Spezies- und Zelltyp-spezifische Unterschiede in seiner circadianen Aktivität auf. Dies unterstreicht die toxikologische Bedeutung der Notwendigkeit von Testsystemen, die relevant für die Testung potentiell humantoxischer Substanzen sind. Das hier etablierte circadiane *in vitro* Testsystem kann dabei als ein gewebespezifisches Modell-System dienen, da es die Wirkung von Fremdstoffen auf die Response humaner Zellen unter Berücksichtigung des circadianen Rhythmus testet. Dies könnte eine Untersuchung der

Zellantwort unter physiologisch relevanten Bedingungen und bei biologisch relevanten Substanzkonzentrationen ermöglichen.

Tatsächlich konnte anhand des hier etablierten circadianen *in vitro* Testsystems gezeigt werden, dass die circadiane Induktion von *CYP1A1* bei höheren Konzentrationen von TCDD weniger ausgeprägt war (Abbildung 38). Bei einer Konzentration von 2 nM TCDD waren die zeitabhängigen Unterschiede der Induktion sehr viel weniger ausgeprägt als bei 0,1 nM TCDD (Abbildung 37, Abbildung 38). Es trat also eine Sättigung ein, welche die Bedeutung der Testung von niedrigen (biologisch relevanten) Konzentrationen hervorhebt, um den optimalen Zeitpunkt der Analyse zu bestimmen und eine maximale Response zu erhalten. Dabei ist ebenfalls zu beachten, dass verschiedene Zelllinien unterschiedlich stark auf Substanzen reagieren. Denn während eine TCDD-Behandlung von 0,1 nM in synchronisierten HME1-Zellen bereits einen deutlichen Induktionsunterschied im Vergleich zu nicht synchronisierten Zellen hervorrief, konnte dies in M13SV1 und HCT116 nicht bestätigt werden.

Dies steht im Einklang mit einer Studie zur Genotoxizität von BaP in drei humanen Zelllinien unterschiedlicher Organe, welche ebenfalls Zelltyp-spezifische Unterschiede in der Response aufdeckte. Außerdem zeigte diese Studie, dass eine DNA-Addukt-Bildung durch BaP-Metabolite in der metabolisch hochaktiven Zelllinie A549 bei geringeren Konzentrationen effizienter ablief, als bei hohen Konzentrationen [299]. Der Einsatz hoher Substanzkonzentrationen in *in vitro* Testsystemen ist also weder biologisch und noch toxikologisch sinnvoll. Eine im Testsystem ermittelte toxikologische Wirkung bei unrealistisch hohen Substanzkonzentrationen spiegelt nicht die reale Exposition und das damit verbundene Gesundheitsrisiko wider. Daher wurde z.B. Omeprazol in einer Validierungsstudie von *in vitro* Methoden zur Detektion der humanen CYP-Induktion als nicht induzierend eingestuft, da eine Induktionsverdopplung erst bei Konzentrationen auftrat, die das klinische Level signifikant überschritten [289].

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass ein circadianes *in vitro* Testsystem das Potential hat, prädiktive Aussagen zu treffen, die eine Bewertung von Chemikalien bei humantoxisch relevanten Konzentrationen zulässt. Weiterhin könnte die Berücksichtigung des zellulären, circadianen Rhythmus durch eine Phasenadjustierung der einzelnen Zellen ein Hilfsmittel sein, die *in vivo* Situation adäquater widerzuspiegeln.



### 4.2.2.3 Substanz-spezifische Effekte im circadianen *in vitro* Testsystem

Neben der Zelltyp- und Dosisabhängigkeit der Response, hing der Dosis-Wirkungs-Verlauf der *CYP1A1*-Induktion ebenfalls von dem eingesetzten Liganden ab (Abbildung 20). Dies kann unterschiedliche Ursachen haben. So kann dies auf die jeweilige Stabilität des Liganden oder die sich unterscheidende Aufnahmeeffizienz der Zellen zurückzuführen sein. Ebenso kann die relative Rezeptoraffinität des AHR zu unterschiedlich verlaufenden Dosis-Wirkung-Kurven führen. Darüber hinaus könnte es an der unterschiedlichen Struktur der Liganden liegen, die anders in der Bindetasche der PAS B-Dömane des AHR binden und zu verschiedenen Konformations-Änderungen des Rezeptor-Liganden-Komplexes führen. In der Folge kann es zur Rekrutierung unterschiedlicher Co-Aktivatoren und somit zu einer Variation der Response kommen [301]. Außerdem kann der AHR je nach Ligand neben dem klassischen Signalweg (Abbildung 3) mit anderen Bindungspartnern heterodimerisieren und infolgedessen andere Gene als die des Fremdstoffmetabolismus regulieren [302]. Die Testung des als endogener AHR-Agonist beschriebenen Tryptophan-Metabolits Kynurenin [163] anhand des hier etablierten circadianen *in vitro* Testsystem ergab interessanterweise nur bei der höchsten Konzentration schwache Induktionsunterschiede der Genexpression von *CYP1A1* (1,5x) in den synchronisierten HME1-Zellen und im Gegensatz zu den anderen verwendeten Liganden keinen Unterschied der *ALDH3A1*-Genexpression. Die 24-stündige Kynurenin-Behandlung von nicht synchronisierten und synchronisierten M13SV1-Zellen zeigte hingegen keine Veränderung des dynamischen Bereichs beider Zielgene [198]. Möglicherweise liegt dies daran, dass Kynurenin eine schnelle Induktion bewirkt, so dass der Zeitpunkt der Analyse – 24 h nach Behandlung – für diese Substanz zu spät und folglich suboptimal ist. Tatsächlich wurde eine Induktion von *CYP1A1* nach 5-stündiger Behandlung in humanen HepG2-Zellen gezeigt, die nach 24 h nicht mehr messbar war [249]. Ein anderer Grund könnte sein, dass der durch Kynurenin aktivierte AHR vorwiegend andere Transkriptionsfaktoren und Signalwege aktiviert als die des Fremdstoffmetabolismus, wie es zum Beispiel bei der Entstehung von Brustkrebs beschrieben wurde [303]. Diese Liganden-abhängige Aktivierung des AHR kann eine Vielzahl biologischer Effekte hervorrufen, die Spezies-, Gewebe-, Zelltyp- und Liganden-abhängig sind. Dies zu berücksichtigen ist bei der Entwicklung und Analyse eines *in vitro* Testsystems unabdingbar .

### 4.2.2.4 Regulation der erhöhten Response

Die hier verwendeten Xenobiotika zeigten eine Aktivierung des kanonischen AHR-Signalwegs mit einer zeitpunkt- und phasenabhängigen Induktion Fremdstoff-metabolisierender Enzyme in den synchronisierten Zellen, die ohne eine Veränderung der Expression des AHR stattfand. Das lässt vermuten, dass die circadiane Regulation möglicherweise auf post-transkriptioneller Ebene stattfand. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die erhöhte *CYP1A1*-Induktion nach 24-stündiger Behandlung der Brustepithelzellen nicht auf eine erhöhte Stabilität der *CYP1A1* mRNA in synchronisierten Zellen zurückzuführen war (Abbildung 40), sondern dass es durch das Entrainment zu einer gesteigerten Promotoraktivität von *CYP1A1* kam (Abbildung 41).

Eine mögliche Interpretation wäre, dass der AHR unter synchronisierten Bedingungen persistenter an der Promotorsequenz der Enzyme des Fremdstoffmetabolismus bindet als in nicht synchronisierten Zellen. Dies könnte dadurch verursacht werden, dass der Import-Export-Shuttle des AHR in den Zellkern in synchronisierten Zellen anders abläuft als in nicht synchronisierten Zellen. Dieser verläuft in Abwesenheit eines exogenen Liganden permanent und schnell, ohne eine Geninduktion zu bewirken, während eine Ligandenbindung den Import verstärkt und in eine Induktion XRE-regulierter Gene resultiert. Dies wird über eine autonome Importsignalsequenz (*nuclear localization signal*, NLS) im AHR vermittelt, während der Export des AHR von der Exportsignalsequenz (*nuclear export signal*, NES) und einer Glutamin-reichen Domäne des Proteins abhängt [285]. Möglicherweise wirkt sich das Entrainment der Zellen auf den Cytoplasma-Kern- Shuttle des AHR aus, so dass es 24 h nach Entrainment zu einer erhöhten Kernlokalisierung des aktiven AHR kommt und folglich der *CYP1A1*-Promotor vermehrt gebunden wird.

Weiterhin könnte die circadiane Synchronisierung dazu führen, dass der AHR eine länger anhaltende Aktivierung des Promotors verursacht, die durch bestimmte Co-Faktoren aufrechterhalten wird. Ein möglicherweise involvierter Transkriptionsfaktor ist Sp1 (*Specificity Protein 1*), der vom AHR an die proximale Promotorregion des XRE rekrutiert wird und gemeinsam mit dem AHR die basale Expression von *CYP1A1* in humanen HepG2-Zellen reguliert [304]. Um eine Induktion von *CYP1A1* zu bewirken, ist eine Dephosphorylierung von Sp1 notwendig [305], die möglicherweise circadian reguliert wird.

Für die Aufklärung der für erhöhte *CYP1A1*-Promotoraktivität in synchronisierten HME1-Zellen verantwortlichen zellulären und molekularen Mechanismen sind weiterführende Studien notwendig. Dies würde eine weitere

Optimierung des *in vitro* Testsystems ermöglichen und damit seine Einsatzfähigkeit erweitern.

### 4.3 Relevanz der Ergebnisse

#### 4.3.1 Relevanz der Ergebnisse für die Chronopharmakologie

*In vivo*-Daten [141], epidemiologische Studien [306] und Chronotherapie-Studien an Krebspatient\*innen [177-181] zeigen, dass der circadiane Rhythmus einen starken Einfluss auf den Metabolismus von Medikamenten haben kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun anhand von toxikologisch relevanten Xenobiotika gezeigt, dass zeitabhängige Effekte in einem circadianen *in vitro* Testsystem nachgewiesen werden können. Dies könnte ebenfalls Anwendung in der Chronopharmakologie finden.

##### 4.3.1.1 Optimierung des Vorscreenings für Medikamente

Circadiane *in vitro* Testsysteme könnten von großem Nutzen sein, um die Wirksamkeit von Medikamenten in Abhängigkeit vom Behandlungszeitpunkt zu screenen. Das scheint besonders im Fall der CYPs relevant zu sein, da 75% aller klinischen Medikamente über CYPs metabolisiert werden [138, 307]. Andererseits gilt die CYP-Induktions-vermittelte Medikamentenwechselwirkung als Problem bei der Entwicklung von Medikamenten und in der Klinik [308-310]. So kann die Aktivierung von CYPs zu einer Arzneimittelwechselwirkung führen, so dass es zu einer Senkung der Wirksamkeit parallel verabreichter Medikamente kommen kann [308]. Um dies zu verhindern, werden potentielle CYP-Induktoren beim Screening von potentiellen Wirkstoffen in der pharmazeutischen Industrie ausgeschlossen [308]. Ein weiterer Grund, dass CYP-induzierende Substanzen beim Screening ausgeschlossen werden, ist die Bildung toxischer Metabolite durch die CYP-vermittelte Bioaktivierung von Substanzen [308], denn bei der Biotransformation der Phase I können hochreaktive Zwischenprodukte entstehen, die DNA-Schäden verursachen und somit karzinogen wirken können. So wird u.a. die Aktivität von CYP1A1, CYP1B1 und CYP2E1 mit toxischen Effekten in Verbindung gebracht [309-312].

Neben der Bildung unerwünschter, toxischer Metabolite kann die CYP-vermittelte Bioaktivierung aber auch gezielt eingesetzt werden, um sogenannte Prodrugs, also inaktive pharmakologische Stoffe, in ihre aktive Form umzuwandeln. Prodrugs werden eingesetzt, um die Bioverfügbarkeit des verabreichten Medikaments zu erhöhen oder eine gezielten Behandlung bestimmter Gewebe zu ermöglichen. CYP-

aktivierte Prodrugs finden unter anderem Anwendung in der Krebstherapie und bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen [313-316].

Die Vorhersage CYP-vermittelter Zellantworten, kann also nicht nur dazu beitragen, CYP-vermittelte Interaktionen verschiedener Medikamente und die Bildung toxischer Metabolite vorherzusagen, sondern auch zu der Entwicklung von Prodrugs beitragen. Die Entwicklung von *in vitro* Testsystemen, welche die *in vivo* Situation möglichst funktional abbilden, ist dabei von großem Interesse, um ethisch umstrittene Tierversuche zu vermeiden. Zusätzlich weisen CYPs spezie-spezifische Unterschiede auf, so dass der Schwerpunkt auf der Entwicklung humaner Testsysteme liegt [317].

Tatsächlich existieren bereits *in vitro* Testsysteme zur Prüfung des CYP-Induktionspotentials von Stoffen [318-320]. Dazu gehören primäre Hepatozyten-Kulturen, Leberschnitte und Mikrosomen-Modelle [307], welche allerdings keine Berücksichtigung circadianer Unterschiede in der Zellantwort vorsehen. Dabei gelten humane Hepatozyten als besonders prädiktiv [289, 321]. Diese liegen jedoch in limitierter Anzahl vor, da sie aus Spendermaterial gewonnen werden und zusätzlich die Schwierigkeit der Inter-Donor-Variabilität der CYP-Aktivität bergen [307, 308]. Alternativ dazu sind CYPs in Leberkrebszelllinien nur sehr schwach exprimiert [307] und daher ebenfalls suboptimal für die Testung von CYP-induzierenden Substanzen geeignet. Tatsächlich wurde in der vielfach verwendeten Leberkrebszelllinie HepG2 nur ein Bruchteil der CYP-Expression primärer Hepatozyten festgestellt (7%) [307].

Besonders interessant wäre es hier, zu untersuchen, inwieweit ein Entrainment primärer Hepatozyten und Leberkrebszellen die Zellantwort hinsichtlich der CYP-Induktion beeinflussen würde. Es ist anzunehmen, dass das Entrainment der Leberzellen die Response ebenso verändert, wie es in dieser Arbeit in Brustepithel- und Darmkrebszellen beobachtet wurde. Das bedeutet, dass falsch negative Ergebnisse durch die Auswahl des optimalen Behandlungszeitfensters und des optimalen Probenanalysezeitpunkts minimiert werden könnten.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass eine Implementierung des circadianen Rhythmus in ein *in vitro* Testsystem zur Analyse der CYP-Induktion dazu beitragen könnte, die Sensitivität der Response und somit die pharmakologische Aussagekraft des Testergebnisses zu erhöhen.

### 4.3.1.2 Chronotherapie und *Clock targeting drugs*

Genom-weite circadiane Expressionsstudien in Nagern, Affen und Menschen haben gezeigt, dass ein Großteil der weltweit bestverkauften Medikamente Gene oder Proteine als Target haben, die einem circadianen Rhythmus unterliegen [31, 322]. Daraus resultiert, dass sich der Behandlungszeitpunkt auf die Wirksamkeit und

Nebenwirkungen eines Medikaments auswirken kann, wie es z.B. für eine Vielzahl von Krebsmedikamenten, darunter Chemotherapeutika und Zytostatika, gezeigt wurde (s. 1.3.2). Andere potentielle Anwendungsbereiche für Chronotherapien sind u.a. Bluthochdruck und die Glukoseregulation. Allerdings mangelt es bislang an umfassenden Analysen zur Bestimmung des Einnahmezeitpunkts [181]. Die Implementierung in klinische Studien wäre mit großem Aufwand verbunden; ebenso wären Tierversuche aus ethischen Gründen und wegen der eingeschränkten Übertragbarkeit auf den Menschen (v.a. bei Versuchen an nachtaktiven Nagern) wenig geeignet. Um eine bessere Translation zu ermöglichen, könnten circadiane *in vitro* Testsysteme für ein Vorscreening eingesetzt werden. Somit könnte bei Substanzen mit bekanntem Wirkmechanismus untersucht werden, zu welchem Behandlungszeitpunkt eine maximale Wirkung vorliegt. Zur Aufdeckung von potentiellen Nebenwirkungen müsste zwar ein komplexeres Testsystem herangezogen werden, dennoch würde die Aufnahme eines circadianen *in vitro* Testsystems in eine Testbatterie bei der Bestimmung des optimalen Behandlungszeitfensters helfen. Zusätzlich könnten *in silico* Methoden in die Testbatterie integriert werden, um vorhandene Daten für die Vorhersage der zeitabhängigen Wirkung und Nebenwirkung einzusetzen.

Neben der Optimierung des Zeitpunkts der Medikamenteneinnahme steht die Entwicklung von Medikamenten im Interesse, die Clockgene als Target haben (s. 1.3.2). Hierbei handelt es sich um einen neuen therapeutischen Ansatz, um Erkrankungen, die mit einem gestörten circadianen Rhythmus in Verbindung stehen, zu behandeln [181]. Dazu gehören Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Gemütszustandsstörungen, Störungen des Metabolismus und Krebs [69-71]. Bislang wurden vermehrt Substanzen entwickelt, deren Targets REVERB $\alpha$  und RORs sind [181, 323]. Die dazu durchgeführten *in vivo* Studien untersuchten vorwiegend die Wirkung der *Clock targeting drugs* in Nagermodellen auf Krebs, inflammatorische und metabolische Erkrankungen und zeigten in allen drei Modellen positive Effekte der eingesetzten Substanzen [181]. Außerdem wurden für einige bereits in der Klinik angewandte *Mood Stabilizer*, Effekte auf den circadianen Rhythmus festgestellt [324]. *Mood Stabilizer* bzw. Phasenprophylaktika sind psychiatrische Pharmazeutika, die bei psychischen Störungen eingesetzt werden. Dazu gehören z.B. Lithiumsalze [325], für die gezeigt wurde, dass sie den circadianen Rhythmus auf post-translationaler Ebene beeinflussen, indem sie unter anderem die Glykogensynthase-Kinase GSK3 inhibieren, die REVERB $\alpha$  und BMAL1 phosphoryliert (s. 1.2.1) [8, 193]. Tatsächlich wird die gezielte Manipulation des circadianen Rhythmus an Patient\*innen mit Gemütszustandsstörungen, wie einer bipolaren Störung, als erfolgsversprechend eingeschätzt [326]. Des Weiteren weisen einige Studien darauf hin, dass eine

pharmakologische Manipulation der Clock-Maschinerie in der Krebstherapie ebenfalls zu Erfolgen führen könnte [181, 188-194]. Unter anderem wurde anhand von humanen Zellkultursystemen und *in vivo*-Versuchen in der Maus gezeigt, dass sich Agonisten von REVERB $\alpha$  selektiv lethal auf Krebszellen und Onkogen-induziert senescente Zellen auswirken, während gesundes Gewebe nicht beeinflusst wurde [327].

Ein circadianes *in vitro* Testsystem könnte eingesetzt werden, um ein Vorscreening von Medikamenten durchzuführen. Dies würde dabei helfen, das Potential ausgewählter Substanzen den circadianen Rhythmus zu beeinflussen, zu ermitteln. In der Tat konnte anhand eines in Screens mit Luciferase-Reporterzellen der humanen Osteosarkoma-Zelllinie U2OS festgestellt werden, dass 5% der 1000 getesteten Moleküle aus einer FDA-Arzneimittelbibliothek einen Einfluss auf den circadianen Rhythmus haben [328]. Ein circadianes *in vitro* Testsystem eignet sich also, um Einflüsse auf die Clock-Maschinerie zu untersuchen. Dabei kann es durch den Einsatz von Zelllinien unterschiedlicher Gewebe und Reporterkonstrukten auf die jeweilige Fragestellung angepasst und im *High-Throughput-Format* (HTS) eingesetzt werden.

### 4.3.2 Relevanz der Ergebnisse für die regulatorische Toxikologie

Die Toxikologie gilt als translationale Wissenschaft, die sich in mehrere Bereiche aufteilen lässt (Arbeits- und Verbraucherschutz, umweltbezogener Gesundheitsschutz, Arzneimitteltoxikologie, klinische Toxikologie) [330]. Die regulatorische Toxikologie dient dabei der Erhebung, Aufbereitung und Bewertung von toxikologischen und epidemiologischen Daten, um die Gefährdung von Mensch, Tier und Umwelt durch u.a. Chemikalien, Biozide, Pestizide, Lebensmittelzusatzstoffe oder Umweltkontaminanten einzuschätzen und zu minimieren. Um dies zu erreichen, werden in einer engen Zusammenarbeit von Behörden, Universitäten, der Industrie und Auftragsinstituten sichere Standards und Normen festgelegt. Die Gewinnung toxikologischer Daten erfolgt dabei mithilfe der experimentellen Toxikologie, die anhand von Standardprotokollen Substanzen auf ihre akuten, toxischen Effekte wie Haut- und Augenreizung oder Sensibilisierung und chronisch, systemische Effekte, einschließlich Kanzerogenität und Reproduktions-Toxizität untersucht [331]. Diese Standardprotokolle sind in den Prüfrichtlinien der OECD verankert und basieren hauptsächlich auf *in vivo* Testsystemen [196].

Die Familie der CYPs spielt aufgrund ihrer wesentlichen Beteiligung am Fremdstoffmetabolismus [128, 131, 332, 333] und ihrer Implikation in der Entstehung potentiell karzinogener Metabolite [136, 334-336] eine große Rolle in der toxikologischen Gefährdungseinschätzung von Substanzen [312, 337, 338]. Des



Weiteren sind die Fremdstoff-Metabolismus-Rezeptoren AHR, CAR und PXR in die Regulierung zahlreicher physiologischer Prozesse involviert, so dass eine Aktivierung dieser Rezeptoren als Biomarker für ein Schlüsselereignis eines adversen Effekts herangezogen werden kann [289, 339]. Die Induktion von Phase I-Enzymen der Leber wird z.B. laut der aktuellen ECHA/EFSA-Richtlinie als Schlüsselereignis von endokriner Disruption in Betracht gezogen [340].

Innerhalb der CYPs ist vor allen Dingen CYP1A1 von toxikologischem Interesse, da es die Biotransformation einer Vielzahl von Xenobiotika, wie Dioxine (z.B. TCDD) und polyzyklische, aromatische Kohlenwasserstoffe (z.B. BaP) katalysiert und somit toxische, mutagene und karzinogene Metabolite bilden kann [234, 312]. Ein sensitives *in vitro* Testsystem, das zur Testung von CYP1A1 induzierenden Substanzen eingesetzt werden kann, wie es in dieser Arbeit vorgestellt wird, ist also von großer Relevanz für die regulatorische Toxikologie.

### **4.3.2.1 Implementierung des circadianen Rhythmus in bestehende Testsysteme in der regulatorischen Toxikologie**

Ein wichtiges Bestreben der regulatorischen Toxikologie ist die Weiterentwicklung der bestehenden Standardprotokolle sowie die Entwicklung neuer Testsysteme zur Verbesserung der wissenschaftlichen Basis, auf der die regulatorischen Entscheidungen getroffen werden [195]. Bei der Vielzahl an Chemikalien, denen der Mensch ausgesetzt ist, ist es ethisch und finanziell nicht möglich, eine umfassende Toxizitätsbestimmung aller Substanzen *in vivo* durchzuführen [299, 341]. Des Weiteren kann bei Ergebnissen aus Tierversuchen vor allem bei der Analyse des Phase I-Fremdstoffmetabolismus nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um Spezies-spezifische Reaktionen handelt. Tatsächlich existieren zahlreiche Studien, die Spezies-spezifische Unterschiede der Enzyminduktion [342, 343] und der Fremdstoffmetabolismus-Rezeptoraktivierung [290, 344-346] beschreiben. Folglich ist die Übertragbarkeit der im Tierversuch erhaltenen Ergebnisse auf den Menschen nicht immer gegeben [317, 347-349].

Betrachtet man vergleichsweise klinische Krebsstudien liegt die Rate der erfolgreichen Extrapolation vom Tierversuchsergebnis auf den Menschen bei nur 8% [348]. Daher liegt der Fokus auf der Weiterentwicklung von humanen *in vitro* Testsystemen, die relevante physiologische Prozesse möglichst getreu abbilden, damit sie in die Regulatorik aufgenommen werden können [350]. Eine Implementierung des circadianen Rhythmus wurde allerdings bislang nicht vorangetrieben.

### *High-Throughput Screening*

Ein Ansatz zum Ausbau von *in vitro* Testsystemen ist die Verwendung von HTS-Methoden, die zum Ziel haben, eine große Anzahl an Chemikalien *in vitro* auf ihre Toxizität zu testen und für weitere Untersuchungen zu priorisieren, um *in vivo* Versuche zu reduzieren [212, 341]. Das *Toxicity Forecaster Project* (ToxCast) ist z.B. ein großangelegtes Projekt, das darauf abzielt, *in vitro* Methoden für Umweltchemikalien zu identifizieren, deren Ergebnisse mit einem *in vivo* Endpunkt assoziiert werden können [341]. Basierend auf den Ergebnissen des ToxCast untersucht die US EPA (in einer gemeinsamen Agenda mit anderen Instituten) mit dem Programm *Toxicology in the 21<sup>st</sup> century* eine große Anzahl von Substanzen (z.B. Chemikalien, Pestizide, Lebensmittelzusatzstoffe, Kontaminanten) mittels automatisierter HTS-Methoden auf ihre Mechanismus-basierte Toxizität [351, 352].

Ein Zellentrainment könnte ohne großen Aufwand in ein HTS-System implementiert werden und somit das Screening und Priorisieren von potentiell toxischen Substanzen optimieren. Die circadiane Synchronität der Zellen könnte zusätzlich zu einer Vermeidung von Fehlinterpretationen beitragen, die die durch Substanzen entstehen können, die sich auf den circadianen Rhythmus auswirken. So ist gezeigt worden, dass genotoxische Substanzen die Induktion von Clock-kontrollierten Genen in Rattenfibroblasten hervorrufen können [210, 211]. Daher sollte die Risikobewertung potentiell genotoxischer Substanzen an synchronisierten Zellen zu unterschiedlichen Behandlungszeiten durchgeführt werden, um valide Biomarker zu eruieren.

Das hier entwickelte circadiane *in vitro* Testsystem könnte dies ermöglichen, da es gezeigt hat, dass die zeitabhängige Response humaner Zellen *in vitro* abgebildet werden kann. Die Tatsache, dass die verstärkte Zellantwort in Zelllinien zweier grundsätzlich unterschiedlicher Gewebe (Brust und Darm) gezeigt wurde, spricht dafür, dass das Testsystem auf andere Gewebe übertragbar ist. Folglich könnten diverse humane, circadiane *in vitro* Testsysteme entwickelt werden, die dazu beitragen, die Gefährdungseinschätzung von Chemikalien in Bezug auf die Gesundheit des Menschen zu optimieren.

### *Adverse Outcome Pathways*

Eine weitere bzw. ergänzende Herangehensweise bei der Entwicklung von *in vitro* Testmethoden, ist das Konzept des *Adverse Outcome Pathways* (AOP) der OECD. Dieses konzentriert sich auf die Identifizierung von *Toxicity Pathways*, beginnend mit dem *Molecular Initiation Event* (MIE); d.h. der direkten Interaktion der



Substanz mit zellulären Komponenten, wie z.B. Rezeptoren. Dieses führt über daraus resultierende Zwischenereignisse, so genannte *Key Events* (KE) letztendlich zu einem gesundheitlich relevanten, adversen Effekt. Mithilfe von *in vitro* Testbatterien, soll das MIE und zentrale KE abgebildet werden [353, 354]. Dies findet bereits in der Einschätzung von Hautsensibilisierung durch chemische Stoffe Anwendung, wie sie von der europäischen Rechtsvorschrift zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe [355] vorgeschrieben ist [355]. Hier sind drei OECD-Prüfrichtlinien zugelassen (OECD 442C; OECD 442E; OECD 442D) [356-358], die drei unterschiedliche KE abbilden und somit als Testbatterie eingesetzt werden. Bemerkenswerterweise sind sie besser mit humanen Daten vergleichbar, als die *in vivo*-Alternative des lokalen Lymphknoten-Assays (LLNA) [359]. Sowohl bei der Prüfrichtlinie 442E [357] als auch bei der Prüfrichtlinie 442D [356] handelt es sich um Zellkulturmethoden, die durch ein Entrainment potentiell in ihrer Response beeinflusst werden könnten. Tatsächlich wurde in den THP-1-Zellen, welche nach der Prüfrichtlinie 442E verwendet wird, ein circadianer Rhythmus der Clockgene nachgewiesen [360]. Interessanterweise wird in dieser Prüfrichtlinie betont, dass eine bestimmte Zelldichte einzuhalten ist, da diese die Expression der zu untersuchenden Oberflächenmarker CD86 und CD54 beeinflusst [357]. In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass sich die Zelldichte auf die Synchronität der Zellen auswirkt. Je dichter die Zellen werden, desto eher folgen sie einem homogenen circadianen Rhythmus, ohne dass ein Stimulus hinzugegeben werden muss (autonomes Entrainment). Möglicherweise gibt es also einen Zusammenhang der Oberflächenmarker-Expression und der circadianen Phase, in der sich die einzelne Zelle befindet. Ein Entrainment der Zellen vor Versuchsbeginn könnte also eine einheitliche Expression der Oberflächenmarker erzeugen und somit Varianzen in den Testergebnissen vermeiden. Außerdem könnte ein optimaler Zeitpunkt bestimmt werden, zu dem das Testergebnis besonders sensitiv ausfällt und damit die Aussagekraft des Testsystems verstärkt werden.

### *Komplexe Zellkultur-Systeme*

*In vitro*-Ansätze haben oftmals den Nachteil, dass sie in ihrer Einfachheit eine geringe physiologische Relevanz aufweisen. So ist ein häufig beobachtetes Phänomen bei dem Vergleich von *in vivo*- mit *in vitro*-Studien die schwächere Response von Zellkultursystemen auf toxische Substanzen im Vergleich zu Untersuchungen *in vivo* [128, 298, 361-365]. So wurde u.a. in einer vergleichenden toxiko-genomischen Studie an Leberproben TCDD-behandelter Mäuse und Leberzellen gezeigt, dass die Induktion der Gene des Fremdstoffmetabolismus zwar adäquat abgebildet wurde, andere Zellantworten sich dagegen aber deutlich unterschieden [366]. Ein Vergleich von

*in vivo* mit *in vitro* Versuchen an humanen Zelllinien zeigte hingegen eine deutlich schwächere Enzymaktivität von CYP1A1 *in vitro* [367].

Daher geht die Entwicklung zu fortgeschrittenen humanen Testsystemen. Durch den Einsatz von Bioreaktoren, Ko-Kultursystemen und Mikrofluidik-Technologien wird die Komplexität von Zellkultursystemen erweitert, um die physiologische Relevanz der Testergebnisse für den Menschen zu erhöhen und sie über einen längeren Zeitraum untersuchen zu können [196, 368]. Dabei werden vor allem humane Primärzellen und reprogrammierte humane pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) verwendet, um die spezies-spezifischen Unterschiede zu umgehen [196]. Letztere werden ebenfalls in Zelltherapien und in der Medikamentenentwicklung eingesetzt und ermöglichen eine individualisierte Therapie [369, 370]. Als positiver Nebeneffekt würde dabei der individuelle Chronotyp des jeweiligen Patienten berücksichtigt. Möglicherweise könnte es auch in der Medikamentenentwicklung von Vorteil sein, Medikamente für spezifische Chronotypen zu entwickeln.

Ein weiteres, besonders komplexes Zellkultursystem, ist das *Organ-on-a-chip*-System, in dem ein oder mehrere Organoide auf einem Mehrkanal-3D-Mikrofluidik-Biochip kultiviert werden, um die Physiologie des jeweiligen Organs bzw. die Kommunikation der Organoide untereinander möglichst realitätsnah zu simulieren [371, 372]. Hierzu müsste konsequenterweise auch die Berücksichtigung des circadianen Rhythmus gehören [373], welcher z.B. mit Hilfe der Mikrofluidik über eine zyklische Hormonausschüttung nachgestellt werden könnte [374]. Allerdings findet der circadiane Rhythmus bei der Entwicklung und Optimierung von *Organ-on-a-chip*-Systemen bislang nur wenig Beachtung [372, 374, 375].

Das hier vorgestellte circadiane *in vitro* Testsystem hat im Gegensatz zu den sehr komplexen, aufwendigen und kostspieligen Systemen den Vorteil, dass es sich um eine Optimierung von *in vitro* Tests handelt, die sehr einfach und preiswert umsetzbar ist. Das simple Protokoll der Zellsynchronisierung führt zu einer erhöhten Response des Zellkultursystems und damit mutmaßlich zu physiologisch relevanteren Ergebnissen als konventionelle *in vitro* Testsysteme. Tatsächlich zeigt das anhand eines Entrainments erweiterte Testsystem eine verstärkte CYP1A1-mRNA-Induktion und -Enzymaktivität nach Behandlung mit AHR-Agonisten. Das lässt die Annahme zu, dass die verminderte CYP1A1-Aktivität, wie sie von Connor et al. (2006) beschrieben wurde [367], wohlmöglich auf ein unzureichendes Versuchsdesign zurückzuführen ist und die *in vivo* Situation durch das in dem hier entwickelten Testsystem implementierte Entrainment der Zellen adäquater widergespiegelt wird.

### 4.3.2.2 Entwicklung circadian basierter Testmethoden in der regulatorischen Toxikologie

In der Chronopharmakologie wird die Eigenschaft von Substanzen, auf die Clock-Maschinerie zu wirken, genutzt, um sie gezielt als Zeitgeber einzusetzen, um chronische Erkrankungen, die mit einem gestörten Rhythmus in Verbindung stehen, zu bekämpfen [181, 188, 194] [192, 193]. Jedoch werden in der regulatorischen Toxikologie aktuell chronodisruptive, also den circadianen Rhythmus störende, Eigenschaften von Substanzen, nicht in die Risikobewertung mit einbezogen. Allerdings wird zunehmend evident, dass eine Störung des circadianen Rhythmus negative Auswirkungen auf die Gesundheit haben kann (s. 1.2.2). Tatsächlich überschneiden sich einige Symptome der circadianen Disruption mit denen eines Stoffwechselsyndroms [68]. Dazu gehören u.a. Bluthochdruck [376, 377], Fettleibigkeit [378], Depressionen [379, 380] und Schlafstörungen [381, 382]. Des Weiteren beeinträchtigt der circadiane Rhythmus die Homöostase des kardiovaskulären Systems, so dass eine Störung des Rhythmus mit Herz- und Gefäßkrankheiten in Verbindung gebracht wird [69, 85, 383]. Gleichermaßen weisen epidemiologische und klinische Daten auf einen Zusammenhang zwischen circadianer Disruption und Krebs hin [71, 384], welcher durch Mausmodelle bestätigt werden konnte [385-387]. *RNA-sequencing*-Analysen konnten in der Tat eine negative Regulation der reprimierenden Clockgene (*PER* und *CRY*) in 14 verschiedenen humanen Tumortypen identifizieren, die maßgeblich mit der Inhibition von Genen assoziiert war, die Apoptose, Zellzykluskontrolle und die Antwort auf DNA-Schäden regulieren [71].

Zusammenfassend konnte klar gezeigt werden, dass ein molekularer Zusammenhang zwischen einer Chronodisruption und der Krebsentstehung besteht [188]. Entsprechend gilt Schichtarbeit, die eine circadiane Disruption mit sich bringt, laut der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) als „wahrscheinlich krebserregend“ (Gruppe 2A)[72]. Gleichzeitig liegen Studien vor, die einen Einfluss verschiedener Xenobiotika auf den circadianen Rhythmus zeigen [179, 388-391]. Unter anderem wurde in einem Lebermodell der Maus eine Auswirkung des am häufigsten verwendeten Weichmachers Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) auf den circadianen Rhythmus festgestellt [390]. Außerdem wurde für mehrere Chemotherapeutika gezeigt, dass sie den circadianen Rhythmus in verschiedenen Geweben der Maus stören [179]; d.h., dass Xenobiotika, wie Arzneimittel, Biozide und Pestizide eine Störung des circadianen Rhythmus hervorrufen können. Ist diese Störung chronisch, kann sie sich schädlich auf die Gesundheit des Menschen ausüben. Dazu gehören kardiovaskuläre

Erkrankungen und Krebs, welche die zwei häufigsten Todesursachen weltweit sind [392, 393].

Bislang beruhen die Standardverfahren der regulatorischen Toxikologie zur Ermittlung von kanzerogenen Effekten auf Tierversuchen [393, 394]. Diese rufen aber wissenschaftliche Bedenken hervor, weil dort mitunter sehr hohe Substanzdosen eingesetzt werden und die Übertragbarkeit auf den Menschen nicht immer gegeben ist [395, 396]. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass die Präkanzerose der Brustdrüse in Mäusen die pathologische Veränderung im Menschen nicht adäquat widerspiegelt [397]. Dementsprechend ist eine große Nachfrage nach Alternativmethoden zum Tierversuch gegeben [398]. Da die Gründe für eine Tumorentstehung multifaktoriell sind [399], ist es notwendig eine möglichst große Anzahl der Faktoren mit in die Entwicklung von *in vitro* Testbatterien einzubeziehen. Das hier vorgestellte circadiane *in vitro* Testsystem hat das Potential die einzelnen Tests hinsichtlich ihrer biologischen Relevanz zu optimieren. Vor allem aber erlaubt es eine Automatisierung im HTS-Format, das ein Screening auf chronodisruptive Eigenschaften von Substanzen ermöglicht, die potentiell gesundheitsschädlich sein könnten. Ein solches Screening nach circadianen Disruptoren könnte einen bedeutenden Fortschritt für die regulatorische Toxikologie darstellen.

### 4.4 Fazit

Der Einfluss des circadianen Rhythmus wird bislang nicht in der regulatorischen Testung von Industriechemikalien, Bioziden oder Pestiziden berücksichtigt. Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse unterstützen jedoch die Annahme vorheriger chronotoxikologischer Studien, dass der circadiane Rhythmus sowohl in *in vivo* als auch in *in vitro* Versuche implementiert werden sollte.

So konnte anhand des hier etablierten circadianen *in vitro* Testsystems gezeigt werden, dass das Testergebnis sowohl vom Zeitpunkt der Probenentnahme als auch von der circadianen Phase abhängt, in der die Zellen behandelt wurden. Im konventionellen Zellkultursystem geht die Synchronität der Zellen aufgrund von fehlenden Entrainment-Stimuli verloren. Als Konsequenz kommt es mitunter zu einer inhomogenen Response der einzelnen Zellen, so dass das Ergebnis an Sensitivität und damit an toxikologischer Aussagekraft verlieren kann. Folglich kann es zu einer Detektion von falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen kommen.

Ein Entrainment der Zellen hingegen, führt zu einer homogenen Response und ermöglicht die Bestimmung eines optimalen Behandlungs- und Probenentnahme-Zeitfensters, um die Sensitivität des Testsystems zu verbessern und Zellantworten bei biologisch relevanten Substanzkonzentrationen zu erhalten. Dies ist prinzipiell für alle Testsysteme gültig, deren Endpunkt durch den circadianen Rhythmus beeinflusst wird. Dazu gehören u.a. Endpunkte welche die Enzyme des Fremdstoffmetabolismus betreffen, da eine Mehrheit von ihnen circadian reguliert wird [126, 178, 184, 400]. Außerdem wurde eine Interaktion des ER $\alpha$  mit dem circadianen System beschrieben (s. 1.2.2.2). Dies konnte anhand der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien nicht nachgewiesen werden, da sie keinen funktionalen ER $\alpha$  exprimieren. Eine alternative ER $\alpha$ -responsive Zelllinie oder die künstliche Überexpression des ER $\alpha$  in einem bestehendem System könnte allerdings ein Screening nach endokrin aktiven Substanzen ermöglichen, die über den ER $\alpha$  wirken.

Bei der Entwicklung neuer circadianer *in vitro* Testsysteme ist es also ausschlaggebend, die Zelllinie entsprechend der Fragestellung auszuwählen. Demzufolge wäre es naheliegend für weitere Untersuchungen des Fremdstoffmetabolismus, Zellen der Leber (als Hauptorgan des Fremdstoffmetabolismus) auf ihre circadiane Responsivität zu untersuchen, da sich die Reaktivität der HME1-Zellen auf den AHR beschränkte. Neben den eingeschränkt verfügbaren primären, humanen Hepatozyten wurden immortalisierte HepaRG-Zellen kürzlich in einer Validierungsstufe als geeignet identifiziert, um die humane *in vivo* Induktion von CYPs abzubilden [289]. Sie wären daher ein vielversprechendes Modell

bei der zukünftigen Untersuchung weiterer Targets, wie der Fremdstoffmetabolismus-Rezeptoren CAR und PXR [401].

Das Zellentrainment *in vitro* ist also ein einfaches Tool zur Optimierung bestehender oder Entwicklung neuer Testsysteme, wie z.B. einem Screening nach circadianen Disruptoren. Aufgrund des kontinuierlichen Bestrebens, Tierversuche zu ersetzen, ist dies von besonderer Relevanz für die regulatorische Toxikologie [350]. Die Implementierung eines Synchronisationsschritts im Methodenprotokoll und eine Behandlung und Probenanalyse zu festgesetzten Zeitpunkten hilft außerdem bei der Standardisierung der Methode. Somit werden Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verringert, welche laut einer *Nature*-Umfrage u.a. auf ein schlechtes Studiendesign zurückzuführen sind [402]. Ein gut strukturiertes Zell-basiertes Testsystem, das den circadianen Rhythmus berücksichtigt, kann somit dazu beitragen, zuverlässige und physiologisch relevante Ergebnisse zu erzeugen, die eine Aufnahme des Testsystems in die Regulatorik erleichtert. Die Chronotoxikologie ist folglich ein vielversprechendes Gebiet der zukünftigen Risikobewertung von toxikologisch relevanten Substanzen.

### 5 Zusammenfassung

Nahezu jeder licht-sensitive Organismus folgt einem circadianen Rhythmus, der ihm eine Anpassung an tageszeitabhängige Veränderungen seiner Umwelt ermöglicht. Es handelt sich dabei um ein endogenes Zeitsystem, das auf Zellebene generiert wird und sowohl das Verhalten als auch die Physiologie rhythmisch reguliert. Zu den circadian regulierten physiologischen Prozessen gehört u.a. der Fremdstoffmetabolismus, so dass die toxikologische Wirkung von Xenobiotika zeitpunktabhängig variieren kann. Dieser Zeit-Wirkungs-Zusammenhang findet bereits in der Chronopharmakologie Beachtung, wird aber in der regulatorischen Toxikologie, die sich mit der Risikobewertung von Chemikalien beschäftigt, nur wenig berücksichtigt. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines circadianen *in vitro* Testsystems anhand dessen untersucht wurde, inwieweit ein *in vitro* rekonstituierter circadianer Rhythmus die Sensitivität eines Zellkultursystems erhöht. Des Weiteren wurde untersucht, ob zeit- und phasenabhängige Effekte der Response auf Xenobiotika *in vitro* abgebildet werden können.

Als *Proof of Concept* wurde die Xenobiotika-vermittelte AHR-Aktivierung – als gängiger toxikologischer Endpunkt – nicht synchronisierter und synchronisierter humaner Brustepithelzellen (HME1) miteinander verglichen, nachdem eine potentielle Beeinträchtigung des Rhythmus durch die verwendeten Substanzen mittels circadianer Biolumineszenz-Reporterzellen ausgeschlossen werden konnte. Hier zeigte sich eine im Vergleich zu nicht synchronisierten Zellen erhöhte Induktion der AHR-responsiven Gene *CYP1A1* und *ALDH3A1* in synchronisierten Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit AHR-Agonisten unterschiedlicher Substanzklassen. Diese synchronisationsabhängige Zellantwort konnte in einer weiteren humanen Brustepithelzelllinie (M13SV1) und zwei verschiedenen Darmkrebszelllinien (HCT116, Caco2) bestätigt werden. Außerdem zeigte sich ein rhythmischer Verlauf der *CYP1A1*-Induktion, die sowohl von der Behandlungsdauer als auch vom Behandlungszeitfenster abhing, wobei diese Zeitabhängigkeit bei niedrigen Dosen besonders ausgeprägt war. Des Weiteren ergab die Analyse der *CYP1A1*-Enzymaktivität der HME1-Zellen, dass sich die erhöhte transkriptionelle Response in synchronisierten Zellen ebenfalls auf funktionaler Ebene widerspiegelt. Initiale Untersuchungen des zugrundeliegenden Mechanismus weisen auf eine circadiane Regulation der *CYP1A1*-Promotoraktivität hin.

Zusammengefasst konnte also gezeigt werden, dass sich der Zeitpunkt der Analyse essentiell auf das Testergebnis auswirkte, wobei dies v.a. bei geringen und damit toxikologisch relevanten Substanzkonzentrationen beobachtet wurde. Dies

ermöglicht eine Optimierung von Testsystemen durch eine Ermittlung optimaler Behandlungszeitfenster, um maximal sensitive Zellantworten zu detektieren und damit die biologische Relevanz des Testsystems zu erhöhen. Der circadiane Rhythmus sollte also nicht nur *in vivo* sondern auch *in vitro* berücksichtigt werden, um die Gefährdungseinstufung von Industriechemikalien, Bioziden und Pestiziden bei biologisch und toxikologisch relevanten Substanzkonzentrationen zu verbessern.



## 6 Summary

Almost every light-sensitive organism follows a circadian rhythm, which allows an adaptation to changes in its environment dependent on the time of day. It is an endogenous time system that is generated at the cellular level and regulates both behaviour as well as physiology rhythmically. The circadian regulated physiological processes include, amongst others, xenobiotic metabolism, such that the toxicological effects of xenobiotics can vary depending on the time of day. This time-effect-relation is already being taken into account in chronopharmacology, but it is given less attention in regulatory toxicology, which deals with the risk assessment of chemicals.

The aim of this study was to establish a circadian *in vitro* test system, to investigate the extent to which an *in vitro* reconstituted circadian rhythm increases the sensitivity of a cell culture system. Furthermore, this study examined whether time and phase-dependent effects of xenobiotic-mediated cell responses can be mapped *in vitro*.

As a proof of concept study, xenobiotic-mediated AHR activation - as a common toxicological endpoint – was analyzed in non-synchronized and synchronized human breast epithelial cells (HME1) after ruling out a potential influence of the applied substances on the reporter gene oscillation. As a result the induction of the AHR-responsive genes *CYP1A1* and *ALDH3A1* was increased in synchronized cells after 24 hours of treatment with AHR agonists of different substance classes when compared to non-synchronized cells. This synchronization-dependent cell response was confirmed in another human breast epithelial cell line and two different colon cancer cell lines. Additionally there was a rhythmic course of *CYP1A1* induction, which depended on both the duration of treatment and the treatment time frame, whereby this time dependence was particularly pronounced at low doses. Furthermore, the analysis of the *CYP1A1* enzyme activity of HME1 cells showed that the increased transcriptional response in synchronized cells is also reflected at the functional level. Initial studies of the underlying mechanism indicated a circadian regulation of the *CYP1A1* promoter activity.

In summary, it could be shown that the time of analysis had an essential impact on the test result. Interestingly, this observation was especially made at low and therefore toxicologically relevant substance concentrations. This enables the optimization of test systems by determining optimal treatment time frames in order to detect maximally sensitive cell responses and thus to increase the biological relevance of the test system. The circadian rhythm should therefore not only be taken into account *in vivo* but also *in vitro* in order to improve the hazard classification of industrial

## Summary

---

chemicals, biocides and pesticides at biologically and toxicologically relevant substance concentrations.

## 7 Anhang

### 7.1 Literaturverzeichnis

1. Dibner, C., U. Schibler, and U. Albrecht, *The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks*. *Annu Rev Physiol*, 2010. **72**: p. 517-49.
2. Dibner, C. and U. Schibler, *Circadian timing of metabolism in animal models and humans*. *J Intern Med*, 2015. **277**(5): p. 513-27.
3. Ma, P., M.A. Woelfle, and C.H. Johnson, *An Evolutionary Fitness Enhancement Conferred by the Circadian System in Cyanobacteria*. *Chaos Solitons Fractals*, 2013. **50**: p. 65-74.
4. Bell-Pedersen, D., et al., *Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms*. *Nat Rev Genet*, 2005. **6**(7): p. 544-56.
5. Silver, R. and M. Rainbow, *The Suprachiasmatic Nucleus and the Circadian Timekeeping System of the Body*, in *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical*, D.W. Pfaff, Editor. 2013, Springer New York: New York, NY. p. 1847-1888.
6. Bhadra, U., et al., *Evolution of circadian rhythms: from bacteria to human*. *Sleep Med*, 2017. **35**: p. 49-61.
7. Hatakeyama, T.S. and K. Kaneko, *Generic temperature compensation of biological clocks by autonomous regulation of catalyst concentration*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. **109**(21): p. 8109-8114.
8. Reischl, S. and A. Kramer, *Kinases and phosphatases in the mammalian circadian clock*. *FEBS Lett*, 2011. **585**(10): p. 1393-9.
9. Dunlap, J.C., *Molecular bases for circadian clocks*. *Cell*, 1999. **96**(2): p. 271-90.
10. Ko, C.H. and J.S. Takahashi, *Molecular components of the mammalian circadian clock*. *Hum Mol Genet*, 2006. **15 Spec No 2**: p. R271-7.
11. Reppert, S.M. and D.R. Weaver, *Coordination of circadian timing in mammals*. *Nature*, 2002. **418**(6901): p. 935-41.
12. King, D.P., et al., *Positional cloning of the mouse circadian clock gene*. *Cell*, 1997. **89**(4): p. 641-53.
13. Griffin, E.A., Jr., D. Staknis, and C.J. Weitz, *Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock*. *Science*, 1999. **286**(5440): p. 768-71.
14. Guillaumond, F., et al., *Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors*. *J Biol Rhythms*, 2005. **20**(5): p. 391-403.
15. Gekakis, N., et al., *Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism*. *Science*, 1998. **280**(5369): p. 1564-9.
16. Yin, L., et al., *Rev-erb $\alpha$ , a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways*. *Science*, 2007. **318**(5857): p. 1786-9.
17. Lee, C., et al., *Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock*. *Cell*, 2001. **107**(7): p. 855-67.
18. Preussner, M. and F. Heyd, *Post-transcriptional control of the mammalian circadian clock: implications for health and disease*. *Pflugers Arch*, 2016. **468**(6): p. 983-91.
19. Green, C.B., *Circadian Posttranscriptional Regulatory Mechanisms in Mammals*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018. **10**(6).
20. Hirano, A., Y.H. Fu, and L.J. Ptacek, *The intricate dance of post-translational modifications in the rhythm of life*. *Nat Struct Mol Biol*, 2016. **23**(12): p. 1053-1060.
21. Ballesta, A., et al., *Systems Chronotherapeutics*. *Pharmacol Rev*, 2017. **69**(2): p. 161-199.
22. Vollmers, C., et al., *Circadian oscillations of protein-coding and regulatory RNAs in a highly dynamic mammalian liver epigenome*. *Cell Metab*, 2012. **16**(6): p. 833-45.

23. Tamayo, A.G., et al., *Histone monoubiquitination by Clock-Bmal1 complex marks Per1 and Per2 genes for circadian feedback*. Nat Struct Mol Biol, 2015. **22**(10): p. 759-66.
24. Le Martelot, G., et al., *Genome-wide RNA polymerase II profiles and RNA accumulation reveal kinetics of transcription and associated epigenetic changes during diurnal cycles*. PLoS Biol, 2012. **10**(11): p. e1001442.
25. Papazyan, R., Y. Zhang, and M.A. Lazar, *Genetic and epigenomic mechanisms of mammalian circadian transcription*. Nat Struct Mol Biol, 2016. **23**(12): p. 1045-1052.
26. Pacheco-Bernal, I., F. Becerril-Perez, and L. Aguilar-Arnal, *Circadian rhythms in the three-dimensional genome: implications of chromatin interactions for cyclic transcription*. Clin Epigenetics, 2019. **11**(1): p. 79.
27. Gachon, F., et al., *The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification*. Cell Metab, 2006. **4**(1): p. 25-36.
28. Panda, S., *Circadian physiology of metabolism*. Science, 2016. **354**(6315): p. 1008-1015.
29. Maury, E., *Off the Clock: From Circadian Disruption to Metabolic Disease*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(7).
30. Zhang, R., et al., *A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(45): p. 16219-24.
31. Anafi, R.C., et al., *CYCLOPS reveals human transcriptional rhythms in health and disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(20): p. 5312-5317.
32. Wittenbrink, N., et al., *High-accuracy determination of internal circadian time from a single blood sample*. J Clin Invest, 2018. **128**(9): p. 3826-3839.
33. Brown, A.J., J.S. Pendergast, and S. Yamazaki, *Peripheral Circadian Oscillators*. Yale J Biol Med, 2019. **92**(2): p. 327-335.
34. Yamazaki, S., et al., *Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats*. Science, 2000. **288**(5466): p. 682-5.
35. Shigeyoshi, Y., et al., *Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript*. Cell, 1997. **91**(7): p. 1043-53.
36. Aton, S.J. and E.D. Herzog, *Come together, right...now: synchronization of rhythms in a mammalian circadian clock*. Neuron, 2005. **48**(4): p. 531-4.
37. Welsh, D.K., J.S. Takahashi, and S.A. Kay, *Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 551-77.
38. Bos, N.P. and M. Mirmiran, *Circadian rhythms in spontaneous neuronal discharges of the cultured suprachiasmatic nucleus*. Brain Res, 1990. **511**(1): p. 158-62.
39. Sukumaran, S., et al., *Circadian rhythms in gene expression: Relationship to physiology, disease, drug disposition and drug action*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. **62**(9-10): p. 904-17.
40. Moore, R.Y. and V.B. Eichler, *Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat*. Brain Res, 1972. **42**(1): p. 201-6.
41. Honma, S., *The mammalian circadian system: a hierarchical multi-oscillator structure for generating circadian rhythm*. J Physiol Sci, 2018. **68**(3): p. 207-219.
42. Gnocchi, D. and G. Bruscalupi, *Circadian Rhythms and Hormonal Homeostasis: Pathophysiological Implications*. Biology (Basel), 2017. **6**(1).
43. Moore, R.Y. and N.J. Lenn, *A retinohypothalamic projection in the rat*. J Comp Neurol, 1972. **146**(1): p. 1-14.
44. Ralph, M.R., et al., *Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period*. Science, 1990. **247**(4945): p. 975-8.
45. Andrews, R.V. and G.E. Folk, Jr., *CIRCADIAN METABOLIC PATTERNS IN CULTURED HAMSTER ADRENAL GLANDS*. Comp Biochem Physiol, 1964. **11**: p. 393-409.
46. Tosini, G. and M. Menaker, *Circadian rhythms in cultured mammalian retina*. Science, 1996. **272**(5260): p. 419-21.

47. Balsalobre, A., F. Damiola, and U. Schibler, *A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells*. Cell, 1998. **93**(6): p. 929-37.
48. Schibler, U. and P. Sassone-Corsi, *A web of circadian pacemakers*. Cell, 2002. **111**(7): p. 919-22.
49. Fang, M., et al., *In Vitro Bioluminescence Assay to Characterize Circadian Rhythm in Mammary Epithelial Cells*. J Vis Exp, 2017(127).
50. Welsh, D.K., et al., *Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression*. Curr Biol, 2004. **14**(24): p. 2289-95.
51. Nagoshi, E., et al., *Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells*. Cell, 2004. **119**(5): p. 693-705.
52. Lande-Diner, L., et al., *Single-cell analysis of circadian dynamics in tissue explants*. Mol Biol Cell, 2015. **26**(22): p. 3940-5.
53. Welsh, D.K., et al., *Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms*. Neuron, 1995. **14**(4): p. 697-706.
54. Izumo, M., et al., *Quantitative analyses of circadian gene expression in mammalian cell cultures*. PLoS Comput Biol, 2006. **2**(10): p. e136.
55. Balsalobre, A., et al., *Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling*. Science, 2000. **289**(5488): p. 2344-7.
56. Yagita, K. and H. Okamura, *Forskolin induces circadian gene expression of rPer1, rPer2 and dbp in mammalian rat-1 fibroblasts*. FEBS Lett, 2000. **465**(1): p. 79-82.
57. So, A.Y., et al., *Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(41): p. 17582-7.
58. Gjerstad, J.K., S.L. Lightman, and F. Spiga, *Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility*. Stress, 2018. **21**(5): p. 403-416.
59. De Kloet, E.R., et al., *Stress, glucocorticoids and development*. Prog Brain Res, 1988. **73**: p. 101-20.
60. Dickmeis, T., *Glucocorticoids and the circadian clock*. J Endocrinol, 2009. **200**(1): p. 3-22.
61. Polidarova, L., et al., *Mechanisms of hormonal regulation of the peripheral circadian clock in the colon*. Chronobiol Int, 2017. **34**(1): p. 1-16.
62. van der Veen, D.R., et al., *Cardiac atrial circadian rhythms in PERIOD2::LUCIFERASE and per1:luc mice: amplitude and phase responses to glucocorticoid signaling and medium treatment*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47692.
63. Nagoshi, E., et al., *Circadian gene expression in cultured cells*. Methods Enzymol, 2005. **393**: p. 543-57.
64. Gaspar, L.S., et al., *The importance of determining circadian parameters in pharmacological studies*. Br J Pharmacol, 2019. **176**(16): p. 2827-2847.
65. Deshayes, N., et al., *Human long-term deregulated circadian rhythm alters regenerative properties of skin and hair precursor cells*. Eur J Dermatol, 2018. **28**(4): p. 467-475.
66. Petrenko, V., Y. Gosmain, and C. Dibner, *High-Resolution Recording of the Circadian Oscillator in Primary Mouse alpha- and beta-Cell Culture*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 68.
67. Pilorz, V., C. Helfrich-Forster, and H. Oster, *The role of the circadian clock system in physiology*. Pflugers Arch, 2018. **470**(2): p. 227-239.
68. Zimmet, P., et al., *The Circadian Syndrome: is the Metabolic Syndrome and much more!* J Intern Med, 2019.
69. Takeda, N. and K. Maemura, *The role of clock genes and circadian rhythm in the development of cardiovascular diseases*. Cell Mol Life Sci, 2015. **72**(17): p. 3225-34.

70. Zaki, N.F.W., et al., *Chronobiological theories of mood disorder*. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2018. **268**(2): p. 107-118.
71. Verlande, A. and S. Masri, *Circadian Clocks and Cancer: Timekeeping Governs Cellular Metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2019. **30**(7): p. 445-458.
72. Stevens, R.G., et al., *Considerations of circadian impact for defining 'shift work' in cancer studies: IARC Working Group Report*. Occup Environ Med, 2011. **68**(2): p. 154-62.
73. Manfredini, R., et al., *Chronobiology of rupture and dissection of aortic aneurysms*. J Vasc Surg, 2004. **40**(2): p. 382-8.
74. Chen, L. and G. Yang, *Recent advances in circadian rhythms in cardiovascular system*. Front Pharmacol, 2015. **6**: p. 71.
75. Morris, C.J., et al., *Circadian misalignment increases cardiovascular disease risk factors in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(10): p. E1402-11.
76. Young, M.E., P. Razeghi, and H. Taegtmeyer, *Clock genes in the heart: characterization and attenuation with hypertrophy*. Circ Res, 2001. **88**(11): p. 1142-50.
77. McNamara, P., et al., *Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptors in the vasculature: a humoral mechanism to reset a peripheral clock*. Cell, 2001. **105**(7): p. 877-89.
78. Leibetseder, V., et al., *Clock genes display rhythmic expression in human hearts*. Chronobiol Int, 2009. **26**(4): p. 621-36.
79. Durgan, D.J. and M.E. Young, *The cardiomyocyte circadian clock: emerging roles in health and disease*. Circ Res, 2010. **106**(4): p. 647-58.
80. Otto, M.E., et al., *Early morning attenuation of endothelial function in healthy humans*. Circulation, 2004. **109**(21): p. 2507-10.
81. Muller, J.E., G.H. Tofler, and P.H. Stone, *Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease*. Circulation, 1989. **79**(4): p. 733-43.
82. Bray, M.S., et al., *Disruption of the circadian clock within the cardiomyocyte influences myocardial contractile function, metabolism, and gene expression*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(2): p. H1036-47.
83. Westgate, E.J., et al., *Genetic components of the circadian clock regulate thrombogenesis in vivo*. Circulation, 2008. **117**(16): p. 2087-95.
84. Xie, Z., et al., *Smooth-muscle BMAL1 participates in blood pressure circadian rhythm regulation*. J Clin Invest, 2015. **125**(1): p. 324-36.
85. Chellappa, S.L., et al., *Impact of Circadian Disruption on Cardiovascular Function and Disease*. Trends Endocrinol Metab, 2019. **30**(10): p. 767-779.
86. Tsang, A.H., et al., *Endocrine regulation of circadian physiology*. J Endocrinol, 2016. **230**(1): p. R1-r11.
87. Gamble, K.L., et al., *Circadian clock control of endocrine factors*. Nat Rev Endocrinol, 2014. **10**(8): p. 466-75.
88. Sen, A. and M.T. Sellix, *The Circadian Timing System and Environmental Circadian Disruption: From Follicles to Fertility*. Endocrinology, 2016. **157**(9): p. 3366-73.
89. WHO, *Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors*. [https://www.who.int/ipcs/publications/new\\_issues/endocrine\\_disruptors/en/](https://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/), 2002.
90. Kabir, E.R., M.S. Rahman, and I. Rahman, *A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health*. Environ Toxicol Pharmacol, 2015. **40**(1): p. 241-58.
91. Gery, S., et al., *The clock gene Per2 links the circadian system to the estrogen receptor*. Oncogene, 2007. **26**(57): p. 7916-20.
92. Rossetti, S., et al., *Entrainment of breast (cancer) epithelial cells detects distinct circadian oscillation patterns for clock and hormone receptor genes*. Cell Cycle, 2012. **11**(2): p. 350-60.



93. Xiang, S., et al., *Oscillation of clock and clock controlled genes induced by serum shock in human breast epithelial and breast cancer cells: regulation by melatonin*. Breast Cancer (Auckl), 2012. **6**: p. 137-50.
94. Lie, J.A., J. Roessink, and K. Kjaerheim, *Breast cancer and night work among Norwegian nurses*. Cancer Causes Control, 2006. **17**(1): p. 39-44.
95. Lee, H.E., et al., *The relationship between night work and breast cancer*. Ann Occup Environ Med, 2018. **30**: p. 11.
96. Cherrie, J.W., *Shedding Light on the Association between Night Work and Breast Cancer*. Ann Work Expo Health, 2019. **63**(6): p. 608-611.
97. Hansen, J., *Night Shift Work and Risk of Breast Cancer*. Curr Environ Health Rep, 2017. **4**(3): p. 325-339.
98. Dumont, M. and J. Paquet, *Progressive decrease of melatonin production over consecutive days of simulated night work*. Chronobiol Int, 2014. **31**(10): p. 1231-8.
99. Benabu, J.C., et al., *[Night work, shift work: Breast cancer risk factor?]*. Gynecol Obstet Fertil, 2015. **43**(12): p. 791-9.
100. Salamanca-Fernandez, E., et al., *Night-shift work and breast and prostate cancer risk: updating the evidence from epidemiological studies*. An Sist Sanit Navar, 2018. **41**(2): p. 211-226.
101. Geiger, S.S., C.T. Fagundes, and R.M. Siegel, *Chrono-immunology: progress and challenges in understanding links between the circadian and immune systems*. Immunology, 2015. **146**(3): p. 349-58.
102. Hriscu, M.L., *Modulatory factors of circadian phagocytic activity*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1057**: p. 403-30.
103. Arjona, A. and D.K. Sarkar, *Circadian oscillations of clock genes, cytolytic factors, and cytokines in rat NK cells*. J Immunol, 2005. **174**(12): p. 7618-24.
104. Silver, A.C., et al., *Circadian expression of clock genes in mouse macrophages, dendritic cells, and B cells*. Brain Behav Immun, 2012. **26**(3): p. 407-13.
105. Arjona, A. and D.K. Sarkar, *Evidence supporting a circadian control of natural killer cell function*. Brain Behav Immun, 2006. **20**(5): p. 469-76.
106. Keller, M., et al., *A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(50): p. 21407-12.
107. Shackelford, P.G. and R.D. Feigin, *Periodicity of susceptibility to pneumococcal infection: influence of light and adrenocortical secretions*. Science, 1973. **182**(4109): p. 285-7.
108. Alamili, M., et al., *Pronounced inflammatory response to endotoxaemia during nighttime: a randomised cross-over trial*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e87413.
109. Guerrero-Vargas, N.N., et al., *Shift Work in Rats Results in Increased Inflammatory Response after Lipopolysaccharide Administration: A Role for Food Consumption*. J Biol Rhythms, 2015. **30**(4): p. 318-30.
110. Cisse, Y.M., et al., *Time-Restricted Feeding Alters the Innate Immune Response to Bacterial Endotoxin*. J Immunol, 2018. **200**(2): p. 681-687.
111. Moravcova, S., et al., *The day/night difference in the circadian clock's response to acute lipopolysaccharide and the rhythmic Stat3 expression in the rat suprachiasmatic nucleus*. PLoS One, 2018. **13**(9): p. e0199405.
112. Coiffard, B., et al., *Circadian Rhythm Disruption and Sepsis in Severe Trauma Patients*. Shock, 2019. **52**(1): p. 29-36.
113. Abele, S.H., et al., *Time is on the Immune System's Side, Yes it is*. Yale J Biol Med, 2019. **92**(2): p. 225-231.
114. Marcheiva, B., et al., *Circadian clocks and metabolism*. Handb Exp Pharmacol, 2013(217): p. 127-55.
115. Vitaterna, M.H., et al., *Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior*. Science, 1994. **264**(5159): p. 719-25.

116. Turek, F.W., et al., *Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice*. Science, 2005. **308**(5724): p. 1043-5.
117. Yang, S., et al., *The role of mPer2 clock gene in glucocorticoid and feeding rhythms*. Endocrinology, 2009. **150**(5): p. 2153-60.
118. Marcheva, B., et al., *Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes*. Nature, 2010. **466**(7306): p. 627-31.
119. Cho, H., et al., *Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB-alpha and REV-ERB-beta*. Nature, 2012. **485**(7396): p. 123-7.
120. Lamia, K.A., K.F. Storch, and C.J. Weitz, *Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 15172-7.
121. Wefers, J., et al., *Circadian misalignment induces fatty acid metabolism gene profiles and compromises insulin sensitivity in human skeletal muscle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(30): p. 7789-7794.
122. Foteinou, P.T., et al., *Computational and experimental insights into the circadian effects of SIRT1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(45): p. 11643-11648.
123. Nakahata, Y., et al., *The NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control*. Cell, 2008. **134**(2): p. 329-40.
124. Asher, G., et al., *SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation*. Cell, 2008. **134**(2): p. 317-28.
125. Dallmann, R., A. Okyar, and F. Levi, *Dosing-Time Makes the Poison: Circadian Regulation and Pharmacotherapy*. Trends Mol Med, 2016. **22**(5): p. 430-445.
126. Claudel, T., et al., *Crosstalk between xenobiotics metabolism and circadian clock*. FEBS Lett, 2007. **581**(19): p. 3626-33.
127. Das, A., et al., *Xenobiotic Metabolism and Gut Microbiomes*. PLoS One, 2016. **11**(10): p. e0163099.
128. Croom, E., *Metabolism of xenobiotics of human environments*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012. **112**: p. 31-88.
129. Fleck, C. and H. Braunlich, *Factors determining the relationship between renal and hepatic excretion of xenobiotics*. Arzneimittelforschung, 1990. **40**(8): p. 942-6.
130. Hagenbuch, B., *Drug uptake systems in liver and kidney: a historic perspective*. Clin Pharmacol Ther, 2010. **87**(1): p. 39-47.
131. Omiecinski, C.J., et al., *Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities*. Toxicol Sci, 2011. **120 Suppl 1**: p. S49-75.
132. Ikegami, K., et al., *Interconnection between circadian clocks and thyroid function*. Nat Rev Endocrinol, 2019. **15**(10): p. 590-600.
133. Whitlock, J.P., Jr., *Induction of cytochrome P4501A1*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999. **39**: p. 103-25.
134. Guengerich, F.P., *Cytochrome P450: what have we learned and what are the future issues?* Drug Metab Rev, 2004. **36**(2): p. 159-97.
135. Sun, Y.W., et al., *Human cytochromes P450 1A1 and 1B1 catalyze ring oxidation but not nitroreduction of environmental pollutant mononitropyrene isomers in primary cultures of human breast cells and cultured MCF-10A and MCF-7 cell lines*. Chem Res Toxicol, 2004. **17**(8): p. 1077-85.
136. Rodriguez-Antona, C. and M. Ingelman-Sundberg, *Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer*. Oncogene, 2006. **25**(11): p. 1679-91.
137. Gonzalez, F.J., *The study of xenobiotic-metabolizing enzymes and their role in toxicity in vivo using targeted gene disruption*. Toxicol Lett, 1998. **102-103**: p. 161-6.
138. Guengerich, F.P., *Cytochrome p450 and chemical toxicology*. Chem Res Toxicol, 2008. **21**(1): p. 70-83.
139. Klingenberg, M., *Pigments of rat liver microsomes*. Arch Biochem Biophys, 1958. **75**(2): p. 376-86.



140. Carmona-Antonanzas, G., et al., *Light- and clock-control of genes involved in detoxification*. *Chronobiol Int*, 2017. **34**(8): p. 1026-1041.
141. Dallmann, R., S.A. Brown, and F. Gachon, *Chronopharmacology: new insights and therapeutic implications*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2014. **54**: p. 339-61.
142. Baes, M., et al., *A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(3): p. 1544-52.
143. Chai, X., S. Zeng, and W. Xie, *Nuclear receptors PXR and CAR: implications for drug metabolism regulation, pharmacogenomics and beyond*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2013. **9**(3): p. 253-66.
144. Kliewer, S.A., et al., *An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway*. *Cell*, 1998. **92**(1): p. 73-82.
145. Guyot, E., et al., *The AhR twist: ligand-dependent AhR signaling and pharmacotoxicological implications*. *Drug Discov Today*, 2013. **18**(9-10): p. 479-86.
146. Mutoh, S., et al., *Dephosphorylation of threonine 38 is required for nuclear translocation and activation of human xenobiotic receptor CAR (NR1I3)*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(50): p. 34785-92.
147. Gachon, F., et al., *The loss of circadian PAR bZip transcription factors results in epilepsy*. *Genes Dev*, 2004. **18**(12): p. 1397-412.
148. Budinsky, R.A., et al., *Mode of action and dose-response framework analysis for receptor-mediated toxicity: The aryl hydrocarbon receptor as a case study*. *Crit Rev Toxicol*, 2014. **44**(1): p. 83-119.
149. Burbach, K.M., A. Poland, and C.A. Bradfield, *Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(17): p. 8185-9.
150. Hahn, M.E., *Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution*. *Chem Biol Interact*, 2002. **141**(1-2): p. 131-60.
151. Nguyen, L.P. and C.A. Bradfield, *The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor*. *Chem Res Toxicol*, 2008. **21**(1): p. 102-16.
152. Hahn, M.E., *The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 1998. **121**(1-3): p. 23-53.
153. Morrison, H.G., et al., *Molecular cloning of CYP1A from the estuarine fish *Fundulus heteroclitus* and phylogenetic analysis of CYP1 genes: update with new sequences*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 1998. **121**(1-3): p. 231-40.
154. Barouki, R., et al., *The aryl hydrocarbon receptor system*. *Drug Metabol Drug Interact*, 2012. **27**(1): p. 3-8.
155. Barouki, R., X. Coumoul, and P.M. Fernandez-Salguero, *The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein*. *FEBS Lett*, 2007. **581**(19): p. 3608-15.
156. Wright, M., *Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor*. *Hum Exp Toxicol*, 1996. **15**(2): p. 176-9.
157. Schmidt, J.V., et al., *Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(13): p. 6731-6.
158. Fernandez-Salguero, P.M., et al., *Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice*. *Vet Pathol*, 1997. **34**(6): p. 605-14.
159. Lund, A.K., et al., *Loss of the aryl hydrocarbon receptor induces hypoxemia, endothelin-1, and systemic hypertension at modest altitude*. *Hypertension*, 2008. **51**(3): p. 803-9.
160. Jaeger, C. and S.A. Tischkau, *Role of Aryl Hydrocarbon Receptor in Circadian Clock Disruption and Metabolic Dysfunction*. *Environ Health Insights*, 2016. **10**: p. 133-41.
161. Cheng, Y., et al., *Editor's Highlight: Microbial-Derived 1,4-Dihydroxy-2-naphthoic Acid and Related Compounds as Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists/Antagonists*:

- Structure-Activity Relationships and Receptor Modeling*. Toxicol Sci, 2017. **155**(2): p. 458-473.
162. Nguyen, N.T., et al., *The roles of aryl hydrocarbon receptor in immune responses*. Int Immunol, 2013. **25**(6): p. 335-43.
163. Opitz, C.A., et al., *An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor*. Nature, 2011. **478**(7368): p. 197-203.
164. Tischkau, S.A., *Mechanisms of circadian clock interactions with aryl hydrocarbon receptor signaling*. Eur J Neurosci, 2019.
165. Lo, R. and J. Matthews, *High-resolution genome-wide mapping of AHR and ARNT binding sites by ChIP-Seq*. Toxicol Sci, 2012. **130**(2): p. 349-61.
166. Davarinos, N.A. and R.S. Pollenz, *Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export*. J Biol Chem, 1999. **274**(40): p. 28708-15.
167. Hankinson, O., *The aryl hydrocarbon receptor complex*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1995. **35**: p. 307-40.
168. Jaeger, C., et al., *Aryl Hydrocarbon Receptor Deficiency Alters Circadian and Metabolic Rhythmicity*. J Biol Rhythms, 2017. **32**(2): p. 109-120.
169. Greb-Markiewicz, B. and M. Kolonko, *Subcellular Localization Signals of bHLH-PAS Proteins: Their Significance, Current State of Knowledge and Future Perspectives*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(19).
170. Yu, W., et al., *Characterization of three splice variants and genomic organization of the mouse BMAL1 gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **260**(3): p. 760-7.
171. Tischkau, S.A., C.D. Jaeger, and S.L. Krager, *Circadian clock disruption in the mouse ovary in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Toxicol Lett, 2011. **201**(2): p. 116-22.
172. Xu, C.X., et al., *Disruption of CLOCK-BMAL1 transcriptional activity is responsible for aryl hydrocarbon receptor-mediated regulation of Period1 gene*. Toxicol Sci, 2010. **115**(1): p. 98-108.
173. Mukai, M., et al., *Behavioral rhythmicity of mice lacking AhR and attenuation of light-induced phase shift by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. J Biol Rhythms, 2008. **23**(3): p. 200-10.
174. Huang, P., S. Ceccatelli, and A. Rannug, *A study on diurnal mRNA expression of CYP1A1, AHR, ARNT, and PER2 in rat pituitary and liver*. Environ Toxicol Pharmacol, 2002. **11**(2): p. 119-26.
175. Richardson, V.M., M.J. Santostefano, and L.S. Birnbaum, *Daily cycle of bHLH-PAS proteins, Ah receptor and Arnt, in multiple tissues of female Sprague-Dawley rats*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **252**(1): p. 225-31.
176. Tredger, J.M. and R.S. Chhabra, *Circadian variations in microsomal drug-metabolizing enzyme activities in rat and rabbit tissues*. Xenobiotica, 1977. **7**(8): p. 481-9.
177. Slat, E.A., et al., *Cell-intrinsic, Bmal1-dependent Circadian Regulation of Temozolomide Sensitivity in Glioblastoma*. J Biol Rhythms, 2017. **32**(2): p. 121-129.
178. Ozturk, N., et al., *Molecular Aspects of Circadian Pharmacology and Relevance for Cancer Chronotherapy*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(10).
179. Levi, F., et al., *Circadian timing in cancer treatments*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010. **50**: p. 377-421.
180. Okazaki, F., et al., *Administering xCT Inhibitors Based on Circadian Clock Improves Antitumor Effects*. Cancer Res, 2017. **77**(23): p. 6603-6613.
181. Sulli, G., et al., *Training the Circadian Clock, Clocking the Drugs, and Drugging the Clock to Prevent, Manage, and Treat Chronic Diseases*. Trends Pharmacol Sci, 2018. **39**(9): p. 812-827.
182. Roenneberg, T., et al., *Epidemiology of the human circadian clock*. Sleep Med Rev, 2007. **11**(6): p. 429-38.

183. Danilenko, K.V., et al., *The hockey-stick method to estimate evening dim light melatonin onset (DLMO) in humans*. Chronobiol Int, 2014. **31**(3): p. 349-55.
184. Ferrell, J.M. and J.Y. Chiang, *Circadian rhythms in liver metabolism and disease*. Acta Pharm Sin B, 2015. **5**(2): p. 113-22.
185. Hughey, J.J., T. Hastie, and A.J. Butte, *ZeitZeiger: supervised learning for high-dimensional data from an oscillatory system*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(8): p. e80.
186. Chen, Z., S.H. Yoo, and J.S. Takahashi, *Development and Therapeutic Potential of Small-Molecule Modulators of Circadian Systems*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2018. **58**: p. 231-252.
187. Wallach, T. and A. Kramer, *Chemical chronobiology: Toward drugs manipulating time*. FEBS Lett, 2015. **589**(14): p. 1530-8.
188. Ye, Y., et al., *The Genomic Landscape and Pharmacogenomic Interactions of Clock Genes in Cancer Chronotherapy*. Cell Syst, 2018. **6**(3): p. 314-328.e2.
189. Kiessling, S., et al., *Enhancing circadian clock function in cancer cells inhibits tumor growth*. BMC Biol, 2017. **15**(1): p. 13.
190. Tang, Q., et al., *Circadian Clock Gene Bmal1 Inhibits Tumorigenesis and Increases Paclitaxel Sensitivity in Tongue Squamous Cell Carcinoma*. Cancer Res, 2017. **77**(2): p. 532-544.
191. Sotak, M., A. Sumova, and J. Pacha, *Cross-talk between the circadian clock and the cell cycle in cancer*. Ann Med, 2014. **46**(4): p. 221-32.
192. Cha, H.K., et al., *Small Molecule Modulators of the Circadian Molecular Clock With Implications for Neuropsychiatric Diseases*. Front Mol Neurosci, 2018. **11**: p. 496.
193. Porcu, A., R. Gonzalez, and M.J. McCarthy, *Pharmacological Manipulation of the Circadian Clock: A Possible Approach to the Management of Bipolar Disorder*. CNS Drugs, 2019.
194. Ohdo, S., S. Koyanagi, and N. Matsunaga, *Chronopharmacological strategies focused on chrono-drug discovery*. Pharmacol Ther, 2019. **202**: p. 72-90.
195. Schwenk, M., M. Werner, and M. Younes, *Regulatory toxicology: objectives and tasks defined by the working group of the German society of experimental and clinical pharmacology and toxicology*. Toxicol Lett, 2002. **126**(3): p. 145-53.
196. Tralau, T., et al., *Regulatory toxicology in the twenty-first century: challenges, perspectives and possible solutions*. Arch Toxicol, 2015. **89**(6): p. 823-50.
197. OECD, *Test Guidelines for the Chemicals*. <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>, 2019.
198. Ndikung, J., et al., *Restoring circadian synchrony in vitro facilitates physiological responses to environmental chemicals*. Environment International, 2020. **134**: p. 105265.
199. Takuma, M., et al., *Influence of dioxin on the daily variation of insulin sensitivity in mice*. Environ Toxicol Pharmacol, 2015. **40**(2): p. 349-51.
200. Hawkins, R., D.F. Kripke, and D.S. Janowsky, *Circadian rhythm of lithium toxicity in mice*. Psychopharmacology (Berl), 1978. **56**(1): p. 113-4.
201. Miura, N., et al., *Multidirectional analyses of hepatic chronotoxicity induced by cadmium in mice*. J Toxicol Sci, 2017. **42**(5): p. 597-604.
202. Levi, F., I. Blazsek, and A. Ferle-Vidovic, *Circadian and seasonal rhythms in murine bone marrow colony-forming cells affect tolerance for the anticancer agent 4'-O-tetrahydropyranyl Adriamycin (THP)*. Exp Hematol, 1988. **16**(8): p. 696-701.
203. Aylward, L.L., et al., *Concentration-dependent TCDD elimination kinetics in humans: toxicokinetic modeling for moderately to highly exposed adults from Seveso, Italy, and Vienna, Austria, and impact on dose estimates for the NIOSH cohort*. J Expo Anal Environ Epidemiol, 2005. **15**(1): p. 51-65.

204. Yassin, A.S. and J.F. Martonik, *Urinary cadmium levels in the U S working population, 1988-1994*. J Occup Environ Hyg, 2004. **1**(5): p. 324-33.
205. Miura, N., et al., *Diurnal variation of cadmium-induced mortality in mice*. J Toxicol Sci, 2012. **37**(1): p. 191-6.
206. Yoshioka, H., et al., *Lethal chronotoxicity induced by seven metal compounds in mice*. J Toxicol Sci, 2018. **43**(2): p. 129-134.
207. Carroll, R., et al., *Diurnal variation in probability of death following self-poisoning in Sri Lanka--evidence for chronotoxicity in humans*. Int J Epidemiol, 2012. **41**(6): p. 1821-8.
208. Gangler, S., et al., *Time of the day dictates the variability of biomarkers of exposure to disinfection byproducts*. Environ Int, 2018. **112**: p. 33-40.
209. Dulong, S., et al., *Identification of Circadian Determinants of Cancer Chronotherapy through In Vitro Chronopharmacology and Mathematical Modeling*. Mol Cancer Ther, 2015. **14**(9): p. 2154-64.
210. Oklejewicz, M., et al., *Phase resetting of the mammalian circadian clock by DNA damage*. Curr Biol, 2008. **18**(4): p. 286-91.
211. Destici, E., et al., *Impact of the circadian clock on in vitro genotoxic risk assessment assays*. Mutat Res, 2009. **680**(1-2): p. 87-94.
212. Cote, I., et al., *The Next Generation of Risk Assessment Multi-Year Study-Highlights of Findings, Applications to Risk Assessment, and Future Directions*. Environ Health Perspect, 2016. **124**(11): p. 1671-1682.
213. Adeleye, Y., et al., *Implementing Toxicity Testing in the 21st Century (TT21C): Making safety decisions using toxicity pathways, and progress in a prototype risk assessment*. Toxicology, 2015. **332**: p. 102-11.
214. Relogio, A., et al., *Ras-mediated deregulation of the circadian clock in cancer*. PLoS Genet, 2014. **10**(5): p. e1004338.
215. Kao, C.-Y., et al., *Two types of normal human breast epithelial cells derived from reduction mammoplasty: phenotypic characterization and response to SV40 transfection*. Carcinogenesis, 1995. **16**(3): p. 531-538.
216. Soto, A.M. and C. Sonnenschein, *The role of estrogens on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7)*. J Steroid Biochem, 1985. **23**(1): p. 87-94.
217. Welsh, D.K., T. Imaizumi, and S.A. Kay, *Real-time reporting of circadian-regulated gene expression by luciferase imaging in plants and mammalian cells*. Methods Enzymol, 2005. **393**: p. 269-88.
218. Yoo, S.H., et al., *PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(15): p. 5339-46.
219. Brown, S.A., et al., *The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals*. PLoS Biol, 2005. **3**(10): p. e338.
220. Schulthess, P., et al., *Signal integration by the CYP1A1 promoter--a quantitative study*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(11): p. 5318-30.
221. Obinata, M., *The immortalized cell lines with differentiation potentials: their establishment and possible application*. Cancer Sci, 2007. **98**(3): p. 275-83.
222. Gruenert, D.C., et al., *Established cell lines used in cystic fibrosis research*. J Cyst Fibros, 2004. **3 Suppl 2**: p. 191-6.
223. Hughes, M.E., et al., *Guidelines for Genome-Scale Analysis of Biological Rhythms*. J Biol Rhythms, 2017. **32**(5): p. 380-393.
224. Ueda, H.R., et al., *System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks*. Nat Genet, 2005. **37**(2): p. 187-92.
225. Tiscornia, G., O. Singer, and I.M. Verma, *Production and purification of lentiviral vectors*. Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 241-5.



226. Hughes, M.E., J.B. Hogenesch, and K. Kornacker, *JTK\_CYCLE: an efficient nonparametric algorithm for detecting rhythmic components in genome-scale data sets*. J Biol Rhythms, 2010. **25**(5): p. 372-80.
227. Levine, J.D., et al., *Signal analysis of behavioral and molecular cycles*. BMC Neurosci, 2002. **3**: p. 1.
228. Straume, M., *DNA microarray time series analysis: automated statistical assessment of circadian rhythms in gene expression patterning*. Methods Enzymol, 2004. **383**: p. 149-66.
229. Wichert, S., K. Fokianos, and K. Strimmer, *Identifying periodically expressed transcripts in microarray time series data*. Bioinformatics, 2004. **20**(1): p. 5-20.
230. Sporn, F., et al., *A circadian clock in HaCaT keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(2): p. 338-48.
231. Jablonska-Trypuc, A., et al., *Toxicological Effects of Traumatic Acid and Selected Herbicides on Human Breast Cancer Cells: In Vitro Cytotoxicity Assessment of Analyzed Compounds*. Molecules, 2019. **24**(9).
232. Stewart, S.A., et al., *Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 12606-11.
233. Li, S., X. Ao, and H. Wu, *The role of circadian rhythm in breast cancer*. Chin J Cancer Res, 2013. **25**(4): p. 442-50.
234. Santes-Palacios, R., et al., *Regulation of Human Cytochrome P4501A1 (hCYP1A1): A Plausible Target for Chemoprevention?* Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 5341081.
235. Rossetti, S., et al., *Identification of an estrogen-regulated circadian mechanism necessary for breast acinar morphogenesis*. Cell Cycle, 2012. **11**(19): p. 3691-700.
236. Rossetti, S. and N. Sacchi, *3D Mammary Epithelial Cell Models: A Goldmine of DCIS Biomarkers and Morphogenetic Mechanisms*. Cancers (Basel), 2019. **11**(2).
237. Martin, M.B., et al., *Regulation of estrogen receptor-alpha expression in MCF-7 cells by taxol*. J Endocrinol, 2004. **180**(3): p. 487-96.
238. Welshons, W.V. and V.C. Jordan, *Adaptation of estrogen-dependent MCF-7 cells to low estrogen (phenol red-free) culture*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1987. **23**(12): p. 1935-9.
239. Romano, A., et al., *Identification of novel ER-alpha target genes in breast cancer cells: gene- and cell-selective co-regulator recruitment at target promoters determines the response to 17beta-estradiol and tamoxifen*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **314**(1): p. 90-100.
240. Wang, C., et al., *Interplay between Dioxin-mediated signaling and circadian clock: a possible determinant in metabolic homeostasis*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(7): p. 11700-12.
241. Hooth, M.J., et al., *Repeated dose toxicity and relative potency of 1,2,3,4,6,7-hexachloronaphthalene (PCN 66) 1,2,3,5,6,7-hexachloronaphthalene (PCN 67) compared to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) for induction of CYP1A1, CYP1A2 and thymic atrophy in female Harlan Sprague-Dawley rats*. Toxicology, 2012. **301**(1-3): p. 85-93.
242. Yoshizawa, K., et al., *A critical comparison of murine pathology and epidemiological data of TCDD, PCB126, and PeCDF*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(7): p. 865-79.
243. Suzuki, G., et al., *Separate screening of brominated and chlorinated dioxins in field samples using in vitro reporter gene assays with rat and mouse hepatoma cell lines*. Anal Chim Acta, 2017. **975**: p. 86-95.
244. Barrett, R.K. and J.S. Takahashi, *Temperature compensation and temperature entrainment of the chick pineal cell circadian clock*. J Neurosci, 1995. **15**(8): p. 5681-92.
245. Buhr, E.D., S.H. Yoo, and J.S. Takahashi, *Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators*. Science, 2010. **330**(6002): p. 379-85.
246. Ollinger, R., et al., *Dynamics of the circadian clock protein PERIOD2 in living cells*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 19): p. 4322-8.

247. Wolff, B., J.J. Sanglier, and Y. Wang, *Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA*. Chem Biol, 1997. **4**(2): p. 139-47.
248. Jang, B.C., et al., *Leptomycin B, an inhibitor of the nuclear export receptor CRM1, inhibits COX-2 expression*. J Biol Chem, 2003. **278**(5): p. 2773-6.
249. Tkachenko, A., et al., *Nuclear transport of the human aryl hydrocarbon receptor and subsequent gene induction relies on its residue histidine 291*. Arch Toxicol, 2018. **92**(3): p. 1151-1160.
250. Kojetin, D., et al., *Identification of SR8278, a synthetic antagonist of the nuclear heme receptor REV-ERB*. ACS Chem Biol, 2011. **6**(2): p. 131-4.
251. Wang, T.T., *beta-naphthoflavone, an inducer of xenobiotic metabolizing enzymes, inhibits firefly luciferase activity*. Anal Biochem, 2002. **304**(1): p. 122-6.
252. Bock, K.W., *The human Ah receptor: hints from dioxin toxicities to deregulated target genes and physiological functions*. Biol Chem, 2013. **394**(6): p. 729-39.
253. Solaimani, P., R. Damoiseaux, and O. Hankinson, *Genome-wide RNAi high-throughput screen identifies proteins necessary for the AHR-dependent induction of CYP1A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Toxicol Sci, 2013. **136**(1): p. 107-19.
254. Strapacova, S., et al., *Relative effective potencies of dioxin-like compounds in rodent and human lung cell models*. Toxicology, 2018. **404-405**: p. 33-41.
255. Clarke, G., et al., *Gut Reactions: Breaking Down Xenobiotic-Microbiome Interactions*. Pharmacol Rev, 2019. **71**(2): p. 198-224.
256. Pejin, B. and M. Glumac, *New cytotoxic natural products from the mangrove biome: covering the period 2007-2015*. Nat Prod Res, 2019. **33**(11): p. 1624-1628.
257. Dasgupta, N., et al., *Thermal co-reduction approach to vary size of silver nanoparticle: its microbial and cellular toxicology*. Environ Sci Pollut Res Int, 2016. **23**(5): p. 4149-63.
258. Titma, T., *The effect of surface charge and pH on the physiological behaviour of cobalt, copper, manganese, antimony, zinc and titanium oxide nanoparticles in vitro*. Toxicol In Vitro, 2018. **50**: p. 11-21.
259. Walker, N.J., et al., *Characterization of the dose-response of CYP1B1, CYP1A1, and CYP1A2 in the liver of female Sprague-Dawley rats following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Toxicol Appl Pharmacol, 1999. **154**(3): p. 279-86.
260. Akashi, M. and E. Nishida, *Involvement of the MAP kinase cascade in resetting of the mammalian circadian clock*. Genes Dev, 2000. **14**(6): p. 645-9.
261. Sandu, C., et al., *Human skin keratinocytes, melanocytes, and fibroblasts contain distinct circadian clock machineries*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(19): p. 3329-39.
262. Fuhr, L., et al., *The Circadian Clock Regulates Metabolic Phenotype Rewiring Via HKDC1 and Modulates Tumor Progression and Drug Response in Colorectal Cancer*. EBioMedicine, 2018. **33**: p. 105-121.
263. Lellupitiyage Don, S.S., et al., *Circadian oscillations persist in low malignancy breast cancer cells*. Cell Cycle, 2019. **18**(19): p. 2447-2453.
264. Zhang, Y.K., R.L. Yeager, and C.D. Klaassen, *Circadian expression profiles of drug-processing genes and transcription factors in mouse liver*. Drug Metab Dispos, 2009. **37**(1): p. 106-15.
265. Fader, K.A., et al., *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin abolishes circadian regulation of hepatic metabolic activity in mice*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 6514.
266. Rogers, E.H., et al., *Comparing Circadian Dynamics in Primary Derived Stem Cells from Different Sources of Human Adult Tissue*. Stem Cells Int, 2017. **2017**: p. 2057168.
267. Pardini, L., et al., *Human intestinal circadian clock: expression of clock genes in colonocytes lining the crypt*. Chronobiol Int, 2005. **22**(6): p. 951-61.
268. Cuesta, M., N. Cermakian, and D.B. Boivin, *Glucocorticoids entrain molecular clock components in human peripheral cells*. Faseb j, 2015. **29**(4): p. 1360-70.

269. Abraham, U., et al., *Quantitative analysis of circadian single cell oscillations in response to temperature*. PLoS One, 2018. **13**(1): p. e0190004.
270. Wang, F., et al., *Activation of Pregnane X Receptor-Cytochrome P450s Axis: A Possible Reason for the Enhanced Accelerated Blood Clearance Phenomenon of PEGylated Liposomes In Vivo*. Drug Metab Dispos, 2019. **47**(8): p. 785-793.
271. Nie, X.Q., et al., *[Establishment of a cell model of insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes]*. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2015. **35**(1): p. 103-8.
272. Bartko, J., et al., *Dissociation between systemic and pulmonary anti-inflammatory effects of dexamethasone in humans*. Br J Clin Pharmacol, 2016. **81**(5): p. 865-77.
273. Vrzal, R., et al., *Dexamethasone controls aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated CYP1A1 and CYP1A2 expression and activity in primary cultures of human hepatocytes*. Chem Biol Interact, 2009. **179**(2-3): p. 288-96.
274. Stejskalova, L., et al., *Dexamethasone accelerates degradation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) and suppresses CYP1A1 induction in placental JEG-3 cell line*. Toxicol Lett, 2013. **223**(2): p. 183-91.
275. Jin, H.L., Y. Choi, and K.W. Jeong, *Crosstalk between Aryl Hydrocarbon Receptor and Glucocorticoid Receptor in Human Retinal Pigment Epithelial Cells*. Int J Endocrinol, 2017. **2017**: p. 5679517.
276. Gaucher, J., E. Montellier, and P. Sassone-Corsi, *Molecular Cogs: Interplay between Circadian Clock and Cell Cycle*. Trends Cell Biol, 2018. **28**(5): p. 368-379.
277. Shostak, A., *Circadian Clock, Cell Division, and Cancer: From Molecules to Organism*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(4).
278. van den Pol, A.N. and F.E. Dudek, *Cellular communication in the circadian clock, the suprachiasmatic nucleus*. Neuroscience, 1993. **56**(4): p. 793-811.
279. To, T.-L., et al., *A Molecular Model for Intercellular Synchronization in the Mammalian Circadian Clock*. Biophysical Journal, 2007. **92**(11): p. 3792-3803.
280. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 363-6.
281. Zhang, E.E., et al., *A genome-wide RNAi screen for modifiers of the circadian clock in human cells*. Cell, 2009. **139**(1): p. 199-210.
282. Vielhaber, E.L., et al., *Nuclear export of mammalian PERIOD proteins*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 45921-7.
283. Miyazaki, K., et al., *Phosphorylation of clock protein PER1 regulates its circadian degradation in normal human fibroblasts*. Biochem J, 2004. **380**(Pt 1): p. 95-103.
284. Takano, A., Y. Isojima, and K. Nagai, *Identification of mPer1 phosphorylation sites responsible for the nuclear entry*. J Biol Chem, 2004. **279**(31): p. 32578-85.
285. Tkachenko, A., et al., *The Q-rich/PST domain of the AHR regulates both ligand-induced nuclear transport and nucleocytoplasmic shuttling*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 32009.
286. Del Olmo, M., A. Kramer, and H. Herzog, *A Robust Model for Circadian Redox Oscillations*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(9).
287. Garrett, R.W. and T.A. Gasiewicz, *The aryl hydrocarbon receptor agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters the circadian rhythms, quiescence, and expression of clock genes in murine hematopoietic stem and progenitor cells*. Mol Pharmacol, 2006. **69**(6): p. 2076-83.
288. Pendergast, J.S. and S. Yamazaki, *The mammalian circadian system is resistant to dioxin*. J Biol Rhythms, 2012. **27**(2): p. 156-63.
289. Bernasconi, C., et al., *Validation of in vitro methods for human cytochrome P450 enzyme induction: Outcome of a multi-laboratory study*. Toxicol In Vitro, 2019. **60**: p. 212-228.
290. Abass, K., et al., *Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides*. Toxicology, 2012. **294**(1): p. 17-26.



291. Choi, S.Y., K.H. Koh, and H. Jeong, *Isoform-specific regulation of cytochromes P450 expression by estradiol and progesterone*. Drug Metab Dispos, 2013. **41**(2): p. 263-9.
292. Radzialowski, F.M. and W.F. Bousquet, *Circadian rhythm in hepatic drug metabolizing activity in the rat*. Life Sci, 1967. **6**(23): p. 2545-8.
293. Nair, V. and R. Casper, *The influence of light on daily rhythm in hepatic drug metabolizing enzymes in rat*. Life Sci, 1969. **8**(23): p. 1291-8.
294. Qu, X., et al., *The clock genes period 1 and period 2 mediate diurnal rhythms in dioxin-induced Cyp1A1 expression in the mouse mammary gland and liver*. Toxicol Lett, 2010. **196**(1): p. 28-32.
295. Tanimura, N., et al., *Aryl hydrocarbon receptor-mediated Cyp1a1 expression is modulated in a CLOCK-dependent circadian manner*. Toxicology, 2011. **290**(2-3): p. 203-7.
296. Schmitt, E.E., et al., *Circadian Regulation of Benzo[a]Pyrene Metabolism and DNA Adduct Formation in Breast Cells and the Mouse Mammary Gland*. Mol Pharmacol, 2017. **91**(3): p. 178-188.
297. Qu, X., et al., *Disruption of clock gene expression alters responses of the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway in the mouse mammary gland*. Mol Pharmacol, 2007. **72**(5): p. 1349-58.
298. Kovalova, N., et al., *Comparative analysis of TCDD-induced AhR-mediated gene expression in human, mouse and rat primary B cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 2017. **316**: p. 95-106.
299. Genies, C., et al., *The extreme variety of genotoxic response to benzo[a]pyrene in three different human cell lines from three different organs*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e78356.
300. Spink, D.C., et al., *Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells*. Carcinogenesis, 1998. **19**(2): p. 291-8.
301. Zhang, S., C. Rowlands, and S. Safe, *Ligand-dependent interactions of the Ah receptor with coactivators in a mammalian two-hybrid assay*. Toxicol Appl Pharmacol, 2008. **227**(2): p. 196-206.
302. Denison, M.S. and S.C. Faber, *And Now for Something Completely Different: Diversity in Ligand-Dependent Activation of Ah Receptor Responses*. Curr Opin Toxicol, 2017. **2**: p. 124-131.
303. Heng, B., et al., *Understanding the role of the kynurenine pathway in human breast cancer immunobiology*. Oncotarget, 2016. **7**(6): p. 6506-20.
304. Ye, W., et al., *AhR regulates the expression of human cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) by recruiting Sp1*. Febs j, 2019. **286**(21): p. 4215-4231.
305. Shimoyama, S., et al., *Dephosphorylation of Sp1 at Ser-59 by protein phosphatase 2A (PP2A) is required for induction of CYP1A1 transcription after treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or omeprazole*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1839**(2): p. 107-15.
306. Gangwisch, J.E., *Epidemiological evidence for the links between sleep, circadian rhythms and metabolism*. Obes Rev, 2009. **10 Suppl 2**: p. 37-45.
307. Donato, M.T., et al., *Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies*. Curr Drug Metab, 2008. **9**(1): p. 1-11.
308. Lin, J.H., *CYP induction-mediated drug interactions: in vitro assessment and clinical implications*. Pharm Res, 2006. **23**(6): p. 1089-116.
309. Badal, S. and R. Delgoda, *Role of the modulation of CYP1A1 expression and activity in chemoprevention*. J Appl Toxicol, 2014. **34**(7): p. 743-53.
310. Murray, G.I., et al., *Profiling the expression of cytochrome P450 in breast cancer*. Histopathology, 2010. **57**(2): p. 202-11.
311. Leung, T., et al., *Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) regulates the response to oxidative stress and migration of breast cancer cells*. Breast Cancer Res, 2013. **15**(6): p. R107.

312. Nebert, D.W., K. Wikvall, and W.L. Miller, *Human cytochromes P450 in health and disease*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2013. **368**(1612): p. 20120431.
313. Zhang, X., et al., *Prodrug strategy for cancer cell-specific targeting: A recent overview*. Eur J Med Chem, 2017. **139**: p. 542-563.
314. Huang, S., et al., *Toxicological profile and safety pharmacology of a single dose of fibroblast activation protein-alpha-based doxorubicin prodrug: in-vitro and in-vivo evaluation*. Anticancer Drugs, 2018. **29**(3): p. 253-261.
315. Keck, M., R. Hmazou, and C. Llorens-Cortes, *Orally Active Aminopeptidase A Inhibitor Prodrugs: Current State and Future Directions*. Curr Hypertens Rep, 2019. **21**(7): p. 50.
316. Ortiz de Montellano, P.R., *Cytochrome P450-activated prodrugs*. Future Med Chem, 2013. **5**(2): p. 213-28.
317. Tralau, T. and A. Luch, *"Drugs on oxygen": an update and perspective on the role of cytochrome P450 testing in pharmacology*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2012. **8**(11): p. 1357-62.
318. Silva, J.M., et al., *Refinement of an in vitro cell model for cytochrome P450 induction*. Drug Metab Dispos, 1998. **26**(5): p. 490-6.
319. Kostrubsky, V.E., et al., *The use of human hepatocyte cultures to study the induction of cytochrome P-450*. Drug Metab Dispos, 1999. **27**(8): p. 887-94.
320. LeCluyse, E.L., *Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation*. Eur J Pharm Sci, 2001. **13**(4): p. 343-68.
321. Ponsoda, X., et al., *Drug biotransformation by human hepatocytes. In vitro/in vivo metabolism by cells from the same donor*. J Hepatol, 2001. **34**(1): p. 19-25.
322. Mure, L.S., et al., *Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues*. Science, 2018. **359**(6381).
323. Kojetin, D.J. and T.P. Burris, *REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets*. Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(3): p. 197-216.
324. Gloston, G.F., S.H. Yoo, and Z.J. Chen, *Clock-Enhancing Small Molecules and Potential Applications in Chronic Diseases and Aging*. Front Neurol, 2017. **8**: p. 100.
325. McIntyre, R.S., et al., *A review of FDA-approved treatment options in bipolar depression*. CNS Spectr, 2013. **18 Suppl 1**: p. 4-20; quiz 21.
326. Porcu, A., R. Gonzalez, and M.J. McCarthy, *Pharmacological Manipulation of the Circadian Clock: A Possible Approach to the Management of Bipolar Disorder*. CNS Drugs, 2019. **33**(10): p. 981-999.
327. Sulli, G., et al., *Pharmacological activation of REV-ERBs is lethal in cancer and oncogene-induced senescence*. Nature, 2018. **553**(7688): p. 351-355.
328. Tamai, T.K., et al., *Identification of circadian clock modulators from existing drugs*. EMBO Mol Med, 2018. **10**(5).
329. Bodnar, A.G., et al., *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*. Science, 1998. **279**(5349): p. 349-52.
330. Gundert-Remy, B., Bürkle, Degen, Landsiedel, *Toxikologie in Deutschland*. Toxikologie in Deutschland 2015, 2015.
331. Schwenk, M., *Aufgaben der regulatorischen Toxikologie*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2003. **46**(7): p. 603-609.
332. Rendic, S.P. and F. Peter Guengerich, *Human cytochrome P450 enzymes 5-51 as targets of drugs and natural and environmental compounds: mechanisms, induction, and inhibition - toxic effects and benefits*. Drug Metab Rev, 2018. **50**(3): p. 256-342.
333. Burkina, V., et al., *Comparison of xenobiotic-metabolising human, porcine, rodent, and piscine cytochrome P450*. Toxicology, 2017. **375**: p. 10-27.
334. Guo, Z., et al., *Targeting cytochrome P450-dependent cancer cell mitochondria: cancer associated CYPs and where to find them*. Cancer Metastasis Rev, 2018. **37**(2-3): p. 409-423.

335. Rendic, S. and F.P. Guengerich, *Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism*. Chem Res Toxicol, 2012. **25**(7): p. 1316-83.
336. Reed, L., V.M. Arlt, and D.H. Phillips, *The role of cytochrome P450 enzymes in carcinogen activation and detoxication: an in vivo-in vitro paradox*. Carcinogenesis, 2018. **39**(7): p. 851-859.
337. EURL/ECVAM, *Multi-study validation trial for cytochrome P450 induction providing a reliable human metabolically competent standard model or method using the human cryopreserved primary hepatocytes and the human cryopreserved HepaRG cell line*. 2012.
338. OECD, *Guidance document on the determination of in vitro intrinsic clearance using cryopreserved hepatocytes (RT-Hep) or liver S9-cellular fractions (RT-S9) from rainbow trout and extrapolation to in vivo intrinsic clearance series on testing and assessment*. [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2018\)12&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2018)12&doclanguage=en), 2018.
339. Hakkola, J., et al., *Cytochrome P450 Induction and Xeno-Sensing Receptors Pregnane X Receptor, Constitutive Androstane Receptor, Aryl Hydrocarbon Receptor and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha at the Crossroads of Toxicokinetics and Toxicodynamics*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2018. **123 Suppl 5**: p. 42-50.
340. ECHA/EFSA, *Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009*. EFSA Journal, 2018.
341. Judson, R.S., et al., *In vitro screening of environmental chemicals for targeted testing prioritization: the ToxCast project*. Environ Health Perspect, 2010. **118**(4): p. 485-92.
342. Martignoni, M., G.M. Groothuis, and R. de Kanter, *Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2006. **2**(6): p. 875-94.
343. Kedderis, G.L. and J.C. Lipscomb, *Application of in vitro biotransformation data and pharmacokinetic modeling to risk assessment*. Toxicol Ind Health, 2001. **17**(5-10): p. 315-21.
344. Kretschmer, X.C. and W.S. Baldwin, *CAR and PXR: xenosensors of endocrine disrupters?* Chem Biol Interact, 2005. **155**(3): p. 111-28.
345. Kiyosawa, N., et al., *Species-specific regulation of PXR/CAR/ER-target genes in the mouse and rat liver elicited by o, p'-DDT*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 487.
346. Kohle, C. and K.W. Bock, *Coordinate regulation of human drug-metabolizing enzymes, and conjugate transporters by the Ah receptor, pregnane X receptor and constitutive androstane receptor*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(4): p. 689-99.
347. Liu, K.D., B.D. Humphreys, and Z.H. Endre, *The ten barriers for translation of animal data on AKI to the clinical setting*. Intensive Care Med, 2017. **43**(6): p. 898-900.
348. Mak, I.W., N. Evaniew, and M. Ghert, *Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment*. Am J Transl Res, 2014. **6**(2): p. 114-8.
349. Leenaars, C.H.C., et al., *Animal to human translation: a systematic scoping review of reported concordance rates*. Journal of Translational Medicine, 2019. **17**(1): p. 223.
350. Burgdorf, T., et al., *Workshop on the validation and regulatory acceptance of innovative 3R approaches in regulatory toxicology - Evolution versus revolution*. Toxicol In Vitro, 2019. **59**: p. 1-11.
351. Tice, R.R., et al., *Improving the human hazard characterization of chemicals: a Tox21 update*. Environ Health Perspect, 2013. **121**(7): p. 756-65.
352. Jennings, P., *"The future of in vitro toxicology"*. Toxicol In Vitro, 2015. **29**(6): p. 1217-21.
353. Delrue, N., et al., *The adverse outcome pathway concept: A basis for developing regulatory decision-making tools*. Altern Lab Anim, 2016. **44**(5): p. 417-429.
354. Ankley, G.T. and S.W. Edwards, *The Adverse Outcome Pathway: A Multifaceted Framework Supporting 21(st) Century Toxicology*. Curr Opin Toxicol, 2018. **9**: p. 1-7.

355. REACH, *Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH)*. 2006.
356. OECD, *Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation*. 2018.
357. OECD, *Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation*. 2018.
358. OECD, *Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation*. 2019.
359. Bauch, C., et al., *Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials*. Regul Toxicol Pharmacol, 2012. **63**(3): p. 489-504.
360. Perez-Aso, M., et al., *Adenosine A2A receptor and TNF-alpha regulate the circadian machinery of the human monocytic THP-1 cells*. Inflammation, 2013. **36**(1): p. 152-62.
361. Gulden, M. and H. Seibert, *Impact of bioavailability on the correlation between in vitro cytotoxic and in vivo acute fish toxic concentrations of chemicals*. Aquat Toxicol, 2005. **72**(4): p. 327-37.
362. Hu, W., et al., *Induction of cyp1a1 is a nonspecific biomarker of aryl hydrocarbon receptor activation: results of large scale screening of pharmaceuticals and toxicants in vivo and in vitro*. Mol Pharmacol, 2007. **71**(6): p. 1475-86.
363. Dobbins, L.L., R.A. Brain, and B.W. Brooks, *Comparison of the sensitivities of common in vitro and in vivo assays of estrogenic activity: application of chemical toxicity distributions*. Environ Toxicol Chem, 2008. **27**(12): p. 2608-16.
364. Heise, T., et al., *In vitro - in vivo correlation of gene expression alterations induced by liver carcinogens*. Curr Med Chem, 2012. **19**(11): p. 1721-30.
365. Schug, M., et al., *Pharmacokinetics explain in vivo/in vitro discrepancies of carcinogen-induced gene expression alterations in rat liver and cultivated hepatocytes*. Arch Toxicol, 2013. **87**(2): p. 337-45.
366. Dere, E., et al., *In vivo-in vitro toxicogenomic comparison of TCDD-elicited gene expression in Hepa1c1c7 mouse hepatoma cells and C57BL/6 hepatic tissue*. BMC Genomics, 2006. **7**: p. 80.
367. Connor, K.T. and L.L. Aylward, *Human response to dioxin: aryl hydrocarbon receptor (AhR) molecular structure, function, and dose-response data for enzyme induction indicate an impaired human AhR*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2006. **9**(2): p. 147-71.
368. Freyer, N., et al., *Metabolism of remimazolam in primary human hepatocytes during continuous long-term infusion in a 3-D bioreactor system*. Drug Des Devel Ther, 2019. **13**: p. 1033-1047.
369. Okano, H. and S. Yamanaka, *iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease*. Molecular Brain, 2014. **7**(1): p. 22.
370. Shi, Y., et al., *Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress*. Nat Rev Drug Discov, 2017. **16**(2): p. 115-130.
371. Sakolish, C.M., et al., *Modeling Barrier Tissues In Vitro: Methods, Achievements, and Challenges*. EBioMedicine, 2016. **5**: p. 30-9.
372. Kratz, S.R.A., et al., *Latest Trends in Biosensing for Microphysiological Organs-on-a-Chip and Body-on-a-Chip Systems*. Biosensors (Basel), 2019. **9**(3).
373. Fustin, J.M., et al., *Rhythm on a chip: circadian entrainment in vitro is the next frontier in body-on-a chip technology*. Curr Opin Pharmacol, 2019. **48**: p. 127-136.
374. Cyr, K.J., O.M. Avaldi, and J.P. Wikswa, *Circadian hormone control in a human-on-a-chip: In vitro biology's ignored component?* Exp Biol Med (Maywood), 2017. **242**(17): p. 1714-1731.
375. Cho, S. and J.Y. Yoon, *Organ-on-a-chip for assessing environmental toxicants*. Curr Opin Biotechnol, 2017. **45**: p. 34-42.
376. Smolensky, M.H., et al., *Role of sleep-wake cycle on blood pressure circadian rhythms and hypertension*. Sleep Med, 2007. **8**(6): p. 668-80.



377. Fabbian, F., et al., *Dipper and non-dipper blood pressure 24-hour patterns: circadian rhythm-dependent physiologic and pathophysiologic mechanisms*. Chronobiol Int, 2013. **30**(1-2): p. 17-30.
378. Stenvers, D.J., et al., *Diurnal rhythms in the white adipose tissue transcriptome are disturbed in obese individuals with type 2 diabetes compared with lean control individuals*. Diabetologia, 2019. **62**(4): p. 704-716.
379. McClung, C.A., *Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders*. Pharmacol Ther, 2007. **114**(2): p. 222-32.
380. McClung, C.A., *How might circadian rhythms control mood? Let me count the ways*. Biol Psychiatry, 2013. **74**(4): p. 242-9.
381. Cedernaes, J., et al., *Acute sleep loss results in tissue-specific alterations in genome-wide DNA methylation state and metabolic fuel utilization in humans*. Sci Adv, 2018. **4**(8): p. eaar8590.
382. Figueiro, M.G. and R.D. White, *Health consequences of shift work and implications for structural design*. J Perinatol, 2013. **33** Suppl 1: p. S17-23.
383. Xu, Y., W. Pi, and R.D. Rudic, *Old and New Roles and Evolving Complexities of Cardiovascular Clocks*. Yale J Biol Med, 2019. **92**(2): p. 283-290.
384. Masri, S. and P. Sassone-Corsi, *The emerging link between cancer, metabolism, and circadian rhythms*. Nat Med, 2018. **24**(12): p. 1795-1803.
385. Papagiannakopoulos, T., et al., *Circadian Rhythm Disruption Promotes Lung Tumorigenesis*. Cell Metab, 2016. **24**(2): p. 324-31.
386. Fu, L., et al., *The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo*. Cell, 2002. **111**(1): p. 41-50.
387. Lee, S., et al., *Disrupting circadian homeostasis of sympathetic signaling promotes tumor development in mice*. PLoS One, 2010. **5**(6): p. e10995.
388. Fletcher, N., et al., *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters the mRNA expression of critical genes associated with cholesterol metabolism, bile acid biosynthesis, and bile transport in rat liver: a microarray study*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **207**(1): p. 1-24.
389. Canaple, L., et al., *Reciprocal regulation of brain and muscle Arnt-like protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor alpha defines a novel positive feedback loop in the rodent liver circadian clock*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(8): p. 1715-27.
390. Currie, R.A., et al., *Gene ontology mapping as an unbiased method for identifying molecular pathways and processes affected by toxicant exposure: application to acute effects caused by the rodent non-genotoxic carcinogen diethylhexylphthalate*. Toxicol Sci, 2005. **86**(2): p. 453-69.
391. Mukai, M. and S.A. Tischkau, *Effects of tryptophan photoproducts in the circadian timing system: searching for a physiological role for aryl hydrocarbon receptor*. Toxicol Sci, 2007. **95**(1): p. 172-81.
392. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
393. Madia, F., et al., *Carcinogenicity assessment: Addressing the challenges of cancer and chemicals in the environment*. Environ Int, 2019. **128**: p. 417-429.
394. OECD, *Test No. 451: Carcinogenicity Studies*. 2018.
395. Cohen, S.M., *The relevance of experimental carcinogenicity studies to human safety*. Current Opinion in Toxicology, 2017. **3**: p. 6-11.
396. Goodman, J.I., *Goodbye to the bioassay*. Toxicol Res (Camb), 2018. **7**(4): p. 558-564.
397. Thayer, K.A. and P.M. Foster, *Workgroup report: National Toxicology Program workshop on Hormonally Induced Reproductive Tumors - Relevance of Rodent Bioassays*. Environ Health Perspect, 2007. **115**(9): p. 1351-6.

398. EU, *DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL*. Official Journal of the European Union, 2010.
399. Anand, P., et al., *Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes*. *Pharmaceutical Research*, 2008. **25**(9): p. 2097-2116.
400. Asher, G. and U. Schibler, *Crosstalk between components of circadian and metabolic cycles in mammals*. *Cell Metab*, 2011. **13**(2): p. 125-37.
401. Lubberstedt, M., et al., *HepaRG human hepatic cell line utility as a surrogate for primary human hepatocytes in drug metabolism assessment in vitro*. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2011. **63**(1): p. 59-68.
402. Baker, M., *1,500 scientists lift the lid on reproducibility*. *Nature*, 2016. **533**(7604): p. 452-4.

## 7.2 Publikationsverzeichnis

### 7.2.1 Publikationen in Fachzeitschriften

Ndikung J, Storm D, Violet N, Kramer A, Schönfelder G, Ertych N, Oelgeschläger M

*Restoring circadian synchrony in vitro facilitates physiological responses to environmental chemicals*

*Environmental International* 2020 Jan; 134:105265;

doi: 10.1016/j.envint.2019.105265

### 7.2.2 Posterpräsentationen

Ndikung J, Ertych N, Storm D, Violet N, Kramer A, Schönfelder G, Oelgeschläger M

*Impact of the circadian rhythm on the sensitivity of in vitro test systems*

DGPT-Tagung, 26.02.- 01.03.2018, Göttingen

Ertych N, Ndikung J, Kramer A, Schönfelder G, Oelgeschläger M

*Restoring circadian synchrony in vitro facilitates physiological responses to environmental chemicals*

Berlin-Oxford Workshop, 07.- 08.11.2019, Berlin



### 7.3 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: TRANSKRIPTIONALE/TRANSLATIONALE RÜCKKOPPLUNGSSCHLEIFE IM SÄUGETIER.....	3
ABBILDUNG 2: CIRCADIANE REGULATION DES FREMDSTOFFMETABOLISMUS.....	13
ABBILDUNG 3: SIGNALWEG DES ARYLHYDROCARBONREZEPTORS .....	15
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES CIRCADIANEN BIOLUMINESZENZ-REPORTERSYSTEMS .....	34
ABBILDUNG 5 :CIRCADIANE CLOCKGENEXPRESSION DER <i>HTERT</i> HME1-ZELLEN.....	40
ABBILDUNG 6: INITIALE BIOLUMINESZENZMESSUNGEN DER HME1-REPORTERZELLEN.....	41
ABBILDUNG 7: ANALYSE DER ERA-GENEXPRESSION IN HME1 UND MCF7 ZELLEN.....	42
ABBILDUNG 8: FEHLENDE MRNA-REGULATION NACH ICI- UND E <sub>2</sub> -BEHANDLUNG IN HME1-ZELLEN.....	43
ABBILDUNG 9: WESTERN BLOT ANALYSE DES ESTROGENREZEPTORS A IN HME1- UND MCF7-ZELLEN .....	44
ABBILDUNG 10: TCDD INDUZIERT <i>CYP1A1</i> IN HME1-ZELLEN.....	45
ABBILDUNG 11: ERHÖHTE <i>CYP1A1</i> -INDUKTION IN SYNCHRONISIERTEN HME1-ZELLEN NACH TCDD-BEHANDLUNG .....	46
ABBILDUNG 12: <i>CYP1A1</i> -INDUKTION IN SYNCHRONISIERTEN HME1-ZELLEN IST AHR-VERMITTELT .....	47
ABBILDUNG 13: UNTERSCHIEDLICH CIRCADIAN SYNCHRONISIERTE ZELLEN ZEIGEN ERHÖHTE <i>CYP1A1</i> -INDUKTION .....	49
ABBILDUNG 14: DEXAMETHASON-ENTRAINMENT ERZEUGT ROBUSTE CIRCADIANE OSZILLATION IN HME1-ZELLEN.....	50
ABBILDUNG 15: <i>CYP1A1</i> WIRD IN SEMI-KONFLUENTEN, NICHT GEHUNGERTEN HME1-ZELLEN NICHT DURCH DEXAMETHASON INDUZIERT .....	51
ABBILDUNG 16: INHIBITION DES KERNEXPORTS HEMMT DEN CIRCADIANEN RHYTHMUS IN HME1-ZELLEN.....	52
ABBILDUNG 17: INHIBITION VON REVERBA HEMMT DEN CIRCADIANEN RHYTHMUS HME1-ZELLEN.....	53
ABBILDUNG 18: EINFLUSS DER AHR-AGONISTEN AUF DIE REPORTERGEN-OSZILLATION IN HME1-ZELLEN.....	54
ABBILDUNG 19: INHIBITORISCHER EFFEKT VON B-NF AUF LUCIFERASEAKTIVITÄT .....	55
ABBILDUNG 20: ERHÖHTE <i>CYP1A1</i> -INDUKTION DURCH ENTRAINMENT IN HME1-ZELLEN.....	57
ABBILDUNG 21: <i>CYP1A1</i> -GENEXPRESSION IN HME1-ZELLEN NACH XENOBIOTIKA-BEHANDLUNG.....	58
ABBILDUNG 22: ERHÖHTER DYNAMISCHER BEREICH DER <i>CYP1A1</i> -INDUKTION IN SYNCHRONISIERTEN HME1-ZELLEN .....	59
ABBILDUNG 23: ERHÖHTE <i>ALDH3A1</i> -INDUKTION DURCH CIRCADIANE SYNCHRONISIERUNG IN HME1-ZELLEN.....	60

## Abbildungsverzeichnis

---

ABBILDUNG 24: <i>ALDH3A1</i> - GENEXPRESSION IN HME1-ZELLEN NACH XENOBIOTIKA-BEHANDLUNG.....	61
ABBILDUNG 25: ERHÖHTER DYNAMISCHER BEREICH DER <i>ALDH3A1</i> -INDUKTION IN SYNCHRONISIERTEN HME1-ZELLEN.....	62
ABBILDUNG 26: RELATIVE GENEXPRESSION DES <i>AHR</i> IN HME1-ZELLEN NACH XENOBIOTIKA-BEHANDLUNG.....	63
ABBILDUNG 27: REPORTERGENOSZILLATION IN M13SV1-ZELLEN.....	64
ABBILDUNG 28: ERHÖHTE <i>CYP1A1</i> -INDUKTION DURCH ENTRAINMENT IN TCDD-BEHANDELTEN M13SV1-ZELLEN.....	65
ABBILDUNG 29: ERHÖHTE <i>CYP1A1</i> -INDUKTION DURCH CIRCADIANE SYNCHRONISIERUNG IN M13SV1-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT WEITEREN XENOBIOTIKA.....	67
ABBILDUNG 30: RELATIVE GENEXPRESSION DES <i>AHR</i> IN M13SV1-ZELLEN NACH XENOBIOTIKA-BEHANDLUNG.....	68
ABBILDUNG 31: REPRÄSENTATIVE BIOLUMINESZENZKURVE DER CIRCADIENEN HCT116-REPORTERZELLINIE.....	69
ABBILDUNG 32: ERHÖHTE <i>CYP1A1</i> -INDUKTION DURCH ENTRAINMENT IN DARMKREBSZELLEN NACH TCDD-BEHANDLUNG.....	70
ABBILDUNG 33: ERHÖHTER DYNAMISCHER BEREICH IN SYNCHRONISIERTEN DARMKREBSZELLEN NACH TCDD-BEHANDLUNG.....	71
ABBILDUNG 34: ERHÖHTE <i>CYP1A1</i> -PROTEINMENGE SYNCHRONISIERTEN HME1-ZELLEN NACH TCDD-BEHANDLUNG.....	73
ABBILDUNG 35: ERHÖHTE <i>CYP1A1</i> -ENZYMAKTIVITÄT IN TCDD-BEHANDELTEN, SYNCHRONISIERTEN HME1-ZELLEN.....	74
ABBILDUNG 36: BASALE EXPRESSION VON <i>CYP1A1</i> UND DEM <i>AHR</i> IN SYNCHRONISIERTEN HME1-ZELLEN.....	75
ABBILDUNG 37: ZEITPUNKTABHÄNGIGKEIT DER <i>CYP1A1</i> -INDUKTION IN HME1-ZELLEN.....	76
ABBILDUNG 38: DOSIS-ABHÄNGIGE <i>CYP1A1</i> -INDUKTION NACH ENTRAINMENT.....	77
ABBILDUNG 39: PHASENABHÄNGIGE <i>CYP1A1</i> -INDUKTION IN HME1-ZELLEN NACH ENTRAINMENT.....	78
ABBILDUNG 40: <i>CYP1A1</i> -MRNA-STABILITÄTSMESSUNG IN NICHT SYNCHRONISIERTEN UND SYNCHRONISIERTEN HME1-ZELLEN NACH TCDD-BEHANDLUNG.....	79
ABBILDUNG 41: ERHÖHTE <i>CYP1A1</i> -PROMOTORAKTIVITÄT IN SYNCHRONISIERTEN M13SV1-ZELLEN NACH TCDD-BEHANDLUNG.....	80

## 7.4 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: LISTE DER VERWENDETEN GERÄTE .....	22
TABELLE 2: LISTE DER VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	23
TABELLE 3: LISTE DER EINGESETZTEN CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN.....	24
TABELLE 4: ZUSAMMENSETZUNG DER VERWENDETEN PUFFER UND LÖSUNGEN.....	25
TABELLE 5: LISTE DER VERWENDETEN ZELLINIEN.....	26
TABELLE 6: LISTE DER ZELLKULTURREAGENZIEN .....	26
TABELLE 7: LISTE DER ZELLKULTURMEDIEN .....	27
TABELLE 8: LISTE DER ZUR TRANSFEKTION VERWENDETEN VEKTOREN .....	28
TABELLE 9: LISTE DER VERWENDETEN KITS .....	28
TABELLE 10: LISTE DER OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE QRT-PCR .....	29
TABELLE 11: LISTE DER FÜR DEN WESTERN BLOT VERWENDETEN ANTIKÖRPER.....	30
TABELLE 12: LISTE DER ANGEWANDTEN SOFTWARE .....	30

## 7.5 Abkürzungsverzeichnis

1,4-DHNA	1,4-Dihydroxy-2-naphthoic acid
A549	Humane Adenokarzinom-Zelllinie der Lunge
ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus, Elimination
AHR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
ALAS1	Delta-aminolevulinate synthase 1
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
AOP	Adverse Outcome Pathway
ARNT	Nuklearer Translokator des Arylhydrocarbon-Rezeptors
BaP	Benzo[a]pyren
BCA	Bicinchoninic Acid
BCL2L1	Genname
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bHLH	Basic helix-loop-helix
BMAL1	Brain and Muscle ARNT-like 1
Caco2	Humane Kolonkarzinom-Zelllinie
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAR	Constitutive androstane receptor
CCND1	Cyclin D1
CLOCK	Circadian Locomotor Output Cycles Kaput
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element-binding protein
CRY	Cryptochrome
CYPs	Cytochrom P450-Enzym
DBP	D-site of albumin promotor binding protein
DEHP	Diethylhexylphthalat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E <sub>2</sub>	1 $\beta$ -Estradiol
E-Box	Enhancer-Box
EGF	Epidermal growth factor
ER $\alpha$	Estrogenrezeptor $\alpha$

## Abkürzungsverzeichnis

---

FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> , Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
H2B	Histone 2B
HCT116	Humane Kolorektalkarzinom-Zelllinie
HLF	Hepatic leucocyte factor
HME1	Humane Brustepithel-Zelllinie
HPA-Achse	Hypothalamus-Pituitary-Adrenal-Achse
hTert	Humane telomerase reverse transcriptase
HTS	High throughput screening
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICI	Imperial Chemical Industries
JEG-3	Humane Plazentachoriokarzinom-Zelllinie
KE	Key event
LLNA	Local lymph node assay
LMB	Leptomycin B
LPS	Lipopolysaccharide
M13SV1	Humane Brustepithelzelllinie
MCF7	Michigan Cancer Foundation 7 (humane Brustkarzinom-Zelllinie)
MDR	Multi Drug resistance
MIE	Molecular Initiating Event
mRNA	Messenger -Ribonukleinsäure
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
PACAP	Pituitary Adenylatecyclase Activating Polypeptide
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR bZIP	Proline and Acicic Amino Acid-rich Basic Leucine Zipper
PAS	Period-Arnt-Singleminded
PER2	Period 2
POR	Cytochrome P450 Oxidoreduktase

## Abkürzungsverzeichnis

---

PXR	Pregnane X receptor
qRT-PCR	Quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion
REACH	Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals
REVERB $\alpha$	Reverse erythroblastic leukemia viral oncogene homolog alpha
RNA	Ribonukleinsäure
RNAseq	Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung
RORE	RetinoicAcid-Related Orphan Receptor Response Element-Binding Site
ROR $\alpha$	Retinoic acid-related Orphan Receptor Alpha
SCN	Suprachiasmatischer Nukleus
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
SIRT	Sirtuin
Sp1	Specificity protein 1
Synch.	synchronisiert
TCDD	2,3,4,7-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TEF	Thyrotroph Embryonic Factor
THP-1	Humane Monozyten
ToxCast	Toxicity Forecaster
U2OS	Humane Ostosarkom-Zelllinie
US EPA	United States Environmental Protection Agency
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
XRE	Xenobiotic response element

### 8 Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Gilbert Schönfelder danken, dass er es mir ermöglicht hat, diese Dissertation am Bundesinstitut für Risikobewertung anzufertigen. Ebenso danke ich meinem Zweitgutachter Prof. Dr. Florian Heyd für die kurzfristige Bereiterklärung meine Dissertation zu begutachten.

Weiterhin gilt ein besonderer Dank Dr. Michael Oelgeschläger für die Idee zum Dissertationsthema und seinen fachlichen Rat, Dr. Norman Ertych für die Betreuung des Projekts und Dorothe Storm für die unermüdliche Unterstützung im Labor.

Außerdem möchte ich Dr. Norman Violet danken, der bei der Auswertung der Reporterzelllinien unersetzlich war, welche dankenswerterweise von Dr. Thomas Wallach (Chronobiologie Charité Universitätsmedizin, Berlin) generiert wurden.

Prof. Dr. Achim Kramer (Chronobiologie Charité Universitätsmedizin, Berlin) möchte ich dafür danken, dass er sein Fachwissen mit uns geteilt und damit die Projektgestaltung weiter vorangetrieben hat.

Ein ganz herzlicher Dank gilt auch meinen Kolleg\*innen für ihre fachliche und v.a. mentale Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Besonders dabei hervorheben möchte ich (in alphabetischer Reihenfolge) Elisa Wistorf, Fanny Knöspel, Frank Schulze, Martin Textor, Philip Bischoff und meine Salatruppe, darunter Julia Scheinpflug, Miriam Bühler, Sarah Schmerbeck und Tra My Tran.

Ein besonderer Dank gilt auch meinem Mann Dr. Bonaventure Soh Bejeng Ndikung, der mich in meinem Promotionsvorhaben unterstützt und an mich geglaubt hat. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Kindern bedanken, dass sie es so oft ausgehalten haben, auf meine Anwesenheit zu verzichten und immer versucht haben, Verständnis für die Situation aufzubringen.

In dem Zusammenhang möchte ich meiner Familie und meinen Freunden dafür danken, dass sie mir den Rücken freigehalten haben. Bonny, meinem Vater, meiner Schwester und meinem Bruder, meiner treuen Freundin Monika und all den lieben Freunden um mich herum, die sich um die Kinder gekümmert haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten, wenn ich sie brauchte. Auch wenn ich nicht alle namentlich nennen kann, weiß ich jede Unterstützung, die mir in den letzten Jahren zuteilwurde, unglaublich zu schätzen und bin unendlich dankbar dafür!



## 9 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Der Einfluss des circadianen Rhythmus auf die Sensitivität von *in vitro*  
Testsystemen“

selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel  
angefertigt habe.

Berlin, den 28.01.2020

Johanna Ndikung