

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

Direktor: Prof. Dr. J. Krutmann
Arbeitsgruppe Toxikologie
Leiter: Prof. Dr. Abel

Untersuchungen zur Regulation des humanen Arylhydrocarbon- Rezeptor-Repressors

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Amitabh Kohli

2006

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

Referent: Prof. Dr. Abel

Korreferentin: Univ. Prof. Dr. Kahl

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Arylhydrocarbon-Rezeptor und mediierte biologische Effekte	1
1.2.	Arylhydrocarbon-Rezeptor-Nukleärer-Translokator	3
1.3.	Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressor und seine Bedeutung für den Arylhydrocarbon-Rezeptor-Signalweg	4
1.4.	Mögliche Funktion des AhRR bei der Niederregulierung AhR-regulierter Gene	6
1.5.	Fragestellung und Ziele der Arbeit	7
2.	Material	8
2.1.	Geräte und Chemikalien	8
2.1.1.	Geräte	8
2.1.2.	Verbrauchsmaterial und Zubehör	8
2.1.3.	Chemikalien	9
2.1.4.	Lösungen und Puffer	9
2.1.5.	Kits	10
2.2.	Biologisches Material	10
2.2.1.	Plasmid-Vektoren	10
2.2.2.	Bakterienkulturen	10
2.2.2.1.	Bakterien	10
2.2.2.2.	Reagenzien für die Bakterienkulturen	10
2.2.2.3.	Nähr- und Selektionsmedien für Bakterienkulturen	11
2.2.3.	Zellkulturen	11
2.2.3.1.	Zelllinien	11
2.2.3.2.	Reagenzien für die Zellkultur	11
2.2.3.3.	Nährmedien für die Zellkultur	12
3.	Methoden	13
3.1.	Polymerase-Ketten-Reaktionen	13
3.1.1.	Primer	13
3.1.2.	Durchführung der PCR-Reaktionen	13
3.2.	Restriktionsreaktionen	14
3.3.	Gelelektrophorese	15

3.4.	DNA-Extraktion aus TBE-Agarose-Gelen	15
3.5.	Sequenzierungen	16
3.6.	Ligation	16
3.7.	Transformation von Epicurian coli XL-1 blue MRF ⁺ kan-Bakterien	16
3.8.	Plasmid-Präparationen	17
3.9.	Transfektionen und Behandlungen von A549- und HepG2-Zellen	17
3.9.1.	Zellanzucht	17
3.9.1.1.	Zellansucht von A549-Zellen	17
3.9.1.2.	Zellanzucht von HepG2-Zellen	17
3.9.2.	Transfektionen	18
3.9.2.1.	Transfektionen von A549-Zellen	18
3.9.2.2.	Transfektionen von HepG2-Zellen	19
3.9.3.	Behandlung von transfizierten Zellen	20
3.9.4.	Ernte der Zellen	21
3.10.	Luminometrische Bestimmung der Luciferase-Aktivität	21
3.11.	Photometrische Bestimmungen	22
3.11.1.	Photometrische Bestimmung von Plasmid-DNA-Konzentrationen	22
3.11.2.	Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen	22
3.12.	Elektronische Datenverarbeitung und Statistik	23
3.12.1.	Sequenzanalysen	23
3.12.2.	Statistik	23
4.	Ergebnisse	24
4.1.	Polymerase-Ketten-Reaktionen und Klonierung	24
4.1.1.	PCR und Klonierung des 800 bp - Fragmentes des Promoters	24
4.1.1.1.	PCR des 800 bp – Fragmentes des Promoters	24
4.1.1.2.	Klonierung des 800 bp – Fragmentes des Promoters	27
4.1.2.	PCR und Klonierung des 1.8 kbp – Fragmentes des Promoters	29
4.1.2.1.	PCR des 1.8 kbp – Fragmentes des Promoters	29
4.1.2.2.	Klonierung des 1.8 kbp – Fragmentes des Promoters	30
4.2.	Sequenzanalysen	32
4.3.	Transfektionsstudien	38
4.3.1.	Basale Aktivität der Promoterkonstrukte in A549- und HepG2-Zellen	38
4.3.2.	BaP-Responsivität der Promoterkonstrukte in A549- und HepG2-Zellen	39

4.3.3.	TGF β - und OSM-Responsivität der Promoterkonstrukte in A549- und HepG2-Zellen	39
5.	Diskussion	41
5.1.	TATAA- und CAAT-Box-freier Promoter, Sp1-Bindungsstellen	41
5.2.	Xenobiotika-Responsive-Elemente und BaP-induzierte Expression	42
5.3.	Interleukin 6-Responsive-Elemente und Responsivität auf Oncostatin M- Behandlung	43
5.4.	Repetitive Sequenzen und putative E-Boxen	43
5.5.	Transforming growth factor β und seine Wirkung auf den Arylhydrocarbon- Rezeptor-Signalweg	44
5.6.	Vergleich des humanen und murinen Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressor- Promoters	45
6.	Zusammenfassung	46
7.	Literatur	47
8.	Abkürzungen	50

1. Einleitung

1.1. Arylhydrocarbon-Rezeptor-Signalweg und medierte biologische Effekte

Der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) gehört zur Gruppe der basic-Helix-Loop-Helix-/Per-Arnt-Sim-Transkriptionsfaktoren (bHLH-/PAS-Transkriptionsfaktoren) (Hankinson, 2005). Diese Transkriptionsfaktoren sind unter anderem dadurch charakterisiert, dass sie ihre biologische Aktivität durch Homo- oder Heterodimerbildung mit Mitgliedern derselben Gruppe von Transkriptionsfaktoren entfalten. Als Dimere haben sie dann die Fähigkeit, an bestimmte regulative Elemente von kontrollierten Genen zu binden und eine Induktion der Expression dieser Gene zu bewirken (Swanson, 2002). Der AhR nimmt dabei in dieser Gruppe von Transkriptionsfaktoren eine Sonderstellung ein, da er der bisher einzige ist, für den eine Ligandenbindung bekannt ist. Liganden des AhR, die diesen Signalweg über eine Bindung an den Rezeptor initiieren, sind u.a. Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs) wie 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) oder Benzo(a)pyren (BaP), die eine Induktion von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus wie Cytochrom P450 Isoform 1A1 (CYP1A1) bewirken (Vrzal et al., 2004; Hankinson, 2005). TCDD ist dabei der am besten erforschte Ligand des AhR und zeigt eine hohe Bindungsaffinität mit starker induktiver Wirkung (Vrzal et al., 2004). Diese sowie weitere Liganden des AhR sind in Tabelle 1 zusammen gefasst. Im Rahmen des AhR-Signalweges liegt der inaktive AhR dabei zunächst in einer Proteinkomplexbindung mit zwei Molekülen des Hitze-Schock-Proteins 90 (heat-shock-protein 90, HSP90), dem Protein p23 sowie dem Hepatitis-B-Virus-X-assoziierten Protein (XAP2, AIP) im Zytoplasma der Zelle vor (Gonzales und Fernandez-Salguero, 1998; Mimura und Fujii-Kuriyama, 2003). HSP90 scheint dabei eine Konformation des AhR zu bewirken, die zu einer hohen Affinität zur Ligandenbindung beiträgt. Ferner scheint HSP90 am Verbleiben des AhR im Zytoplasma beteiligt zu sein, möglicherweise durch ein Verdecken der Nukleären-Lokalisierungs-Sequenz (nuclear localisation sequence, NLS) (Kewley et al., 2004). Nach Ligandenbindung an den AhR kommt es zu einer Translokation in den Zellkern, HSP90 wird vom AhR abgespalten und im Rahmen einer Heterodimerbildung durch den Arylhydrocarbon-Rezeptor-Nukleären-Translokator (Arylhydrocarbon-receptor-nuclear-translocator, Arnt) ersetzt. Dieses Heterodimer stellt den vollständigen Transkriptionsfaktor-Komplex dar, der über die Bindung an seine spezifische Erkennungssequenz in regulativen Genabschnitten, die Xenobiotika-responsiven-Elemente (XRE), zur Steigerung der Expression von AhR-regulierten Genen, z.B. Cytochrom P450 Isoform 1A1 führt (Mimura et al., 1999). Dieser Signalweg, der in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist, ist neben der Induktion von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus beteiligt an einer Vielzahl von toxischen Effekten von BaP und

TCDD wie Teratogenese, Tumorpromotion und Immunsuppression (Mimura und Fujii-Kuriyama, 2003). Den wichtigsten Anhalt für die Annahme, dass die toxische Wirkung des TCDD dabei tatsächlich AhR-vermittelt ist, lieferten Studien mit AhR-Knockout-Mäusen, die eine sehr hohe Resistenz gegenüber TCDD-bedingter Toxizität zeigten (Gonzales und Fernandez-Salguero, 1998). Weitere Studien mit AhR-Knockout-Mäusen zeigten aber auch eine Beteiligung des AhR an der Organogenese in der Embryonalentwicklung mit phänotypischen Merkmalen wie eine verringerte Lebergröße, wobei diese mit kleineren Leberzellen und einer deutlich reduzierten Lebervaskularisation und konsekutiven portosystemischen Shuntphänomenen einher ging (Lahvis et al., 2000). Dies wird als Hinweis für die Existenz eines endogenen Liganden des AhR interpretiert, der bisher aber noch nicht identifiziert werden konnte (Lahvis et al., 2000).

Tabelle 1: Liganden des AhR

Umweltgifte	Polychlorierte Dibenzo-para-Dioxine (z.B. TCDD)
	Polychlorierte aromatische Hydrocarbone
Nahrungsmittelbestandteile	Heterozyklische Amine
	Chlorierte Biphenyle
Pflanzenbestandteile	Indole
	Flavenole und Flavonoide
Pharmazeutika	Omeprazol
	Synthetische Retinoide

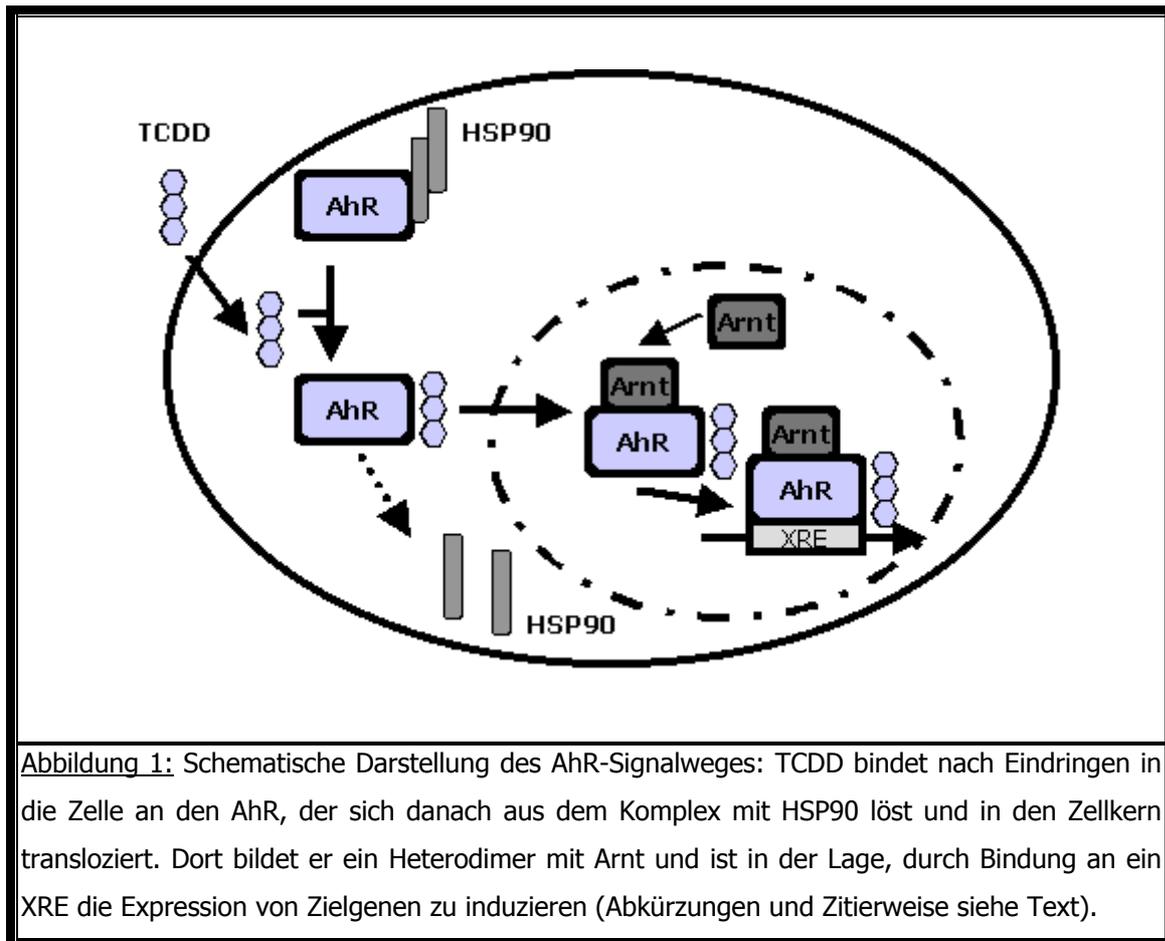


Abbildung 1: Schematische Darstellung des AhR-Signalweges: TCDD bindet nach Eindringen in die Zelle an den AhR, der sich danach aus dem Komplex mit HSP90 löst und in den Zellkern transloziert. Dort bildet er ein Heterodimer mit Arnt und ist in der Lage, durch Bindung an ein XRE die Expression von Zielgenen zu induzieren (Abkürzungen und Zitierweise siehe Text).

1.2. Arylhydrocarbon-Rezeptor-Nukleärer-Translokator

Der Arylhydrocarbon-Rezeptor-Nukleäre-Translokator (Arnt) ist wie der AhR ein bHLH/PAS-Transkriptionsfaktor und fungiert als Dimerisierungspartner für andere bHLH/PAS-Transkriptionsfaktoren (Gonzales und Fernandez-Salguero, 1998). Er verfügt über eine NLS im N-terminalen Teil des Proteins, die sein Verweilen im Kern bedingt (Kewley et al., 2004). Zudem finden sich bei Arnt separate Sequenzen zur Transaktivierung sowie zur DNA-Bindung und zur Dimerisierung (Hankinson, 2005). Dabei scheint die Erkennungssequenz für die DNA-Bindung ein E-Box-Element mit der Konsensus-Sequenz CACGTG zu sein. Transiente Transfektionsstudien konnten dabei zeigen, dass Arnt in der Lage ist, Gene mit dieser Sequenz im Promoter zu induzieren (Antonsson et al., 1995).

Die große funktionelle Bedeutung des Arnt wurde durch Knockout-Experimente gezeigt. Arnt-defiziente embryonale Stammzellen der Maus zeigten einen Ausfall der Aktivierung von Hypoxie-induzierten Genen sowie eine lethal verlaufende Embryonalentwicklung (Kewley et al., 2004). Dies wird durch die Beteiligung des Arnt an der Expression von Genen erklärt, die durch Hypoxie induziert werden, so dass in Abwesenheit von Arnt die zelluläre Antwort auf

die Hypoxie, die durch das Zellwachstum in der Embryonalentwicklung entsteht, ausbleibt (Maltepe et al., 1997). Während die Rolle des Arnt als Heterodimerisierungspartner für andere bHLH/PAS-Proteine weitgehend verstanden ist, fehlt eine genauere Charakterisierung der funktionellen Bedeutung von Arnt-Homodimeren, die ebenso gebildet werden wie Heterodimere mit bHLH/PAS-Proteinen (Kewley et al., 2004; Swanson und Yang, 1999).

1.3. Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressor und seine Bedeutung für den Arylhydrocarbon-Rezeptor-Signalweg

Mimura et al. gelang es 1999, mit der Entdeckung des Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressors (AhRR) einen neuen Regulationsmechanismus der AhR-Signalkaskade zu beschreiben. Sie zeigten in ihrer Arbeit, dass es sich bei dem AhRR wie beim AhR um ein bHLH-PAS-Protein handelt, das über eine Heterodimerbildung mit Arnt und konsekutive Bindung an XRE in der Lage ist, den AhR-Signalweg zu supprimieren. Diese Funktion des AhRR und die damit verbundene Interferenz mit dem AhR-Signalweg ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Der strukturelle Aufbau des AhRR und die darin enthaltenen Unterschiede zum AhR und Arnt sind in Abbildung 3 dargestellt und determinieren seine biologische Funktion. Er hat wie der AhR und Arnt am N-terminalen Ende des Proteins eine bHLH-Domäne zur Bindung an DNA-Erkennungssequenzen in regulativen Genabschnitten und verfügt über eine PAS-A-Domäne zur Heterodimerbildung mit Arnt. Eine PAS-B-Domäne wie beim AhR und beim Arnt ist aber ebensowenig zu finden wie die im C-terminalen Ende des AhR oder Arnt gelegene Transaktivierungsdomäne (TAD) zur Rekrutierung von Polymerasen (Mimura et al., 1999). Somit liegt mit dem AhRR ein Transkriptionsfaktor vor, der über eine Heterodimerbildung mit Arnt in der Lage ist, an die gleichen DNA-Erkennungssequenzen, namentlich die XRE, zu binden wie das AhR-Arnt-Heterodimer, während eine Transaktivierung von Polymerasen zur Transkription regulierter Gene nicht ausgelöst wird. Dies bedeutet eine kompetitive Hemmung der AhR-Arnt-vermittelten Signaltransduktion. Baba et al. zeigten dann 2001 durch Sequenzanalysen des murinen AhRR-Gens und dessen Promoterbereich sowie durch Reporteragen-Assays, dass der AhRR der Maus durch den AhR-Signalweg via im Promoterbereich enthaltener, funktionell aktiver XRE induzierbar ist, was sie vermuten ließ, dass der AhRR Teil einer negativen Rückkopplungsschleife der durch den AhR mediierten Signaltransduktion sei.

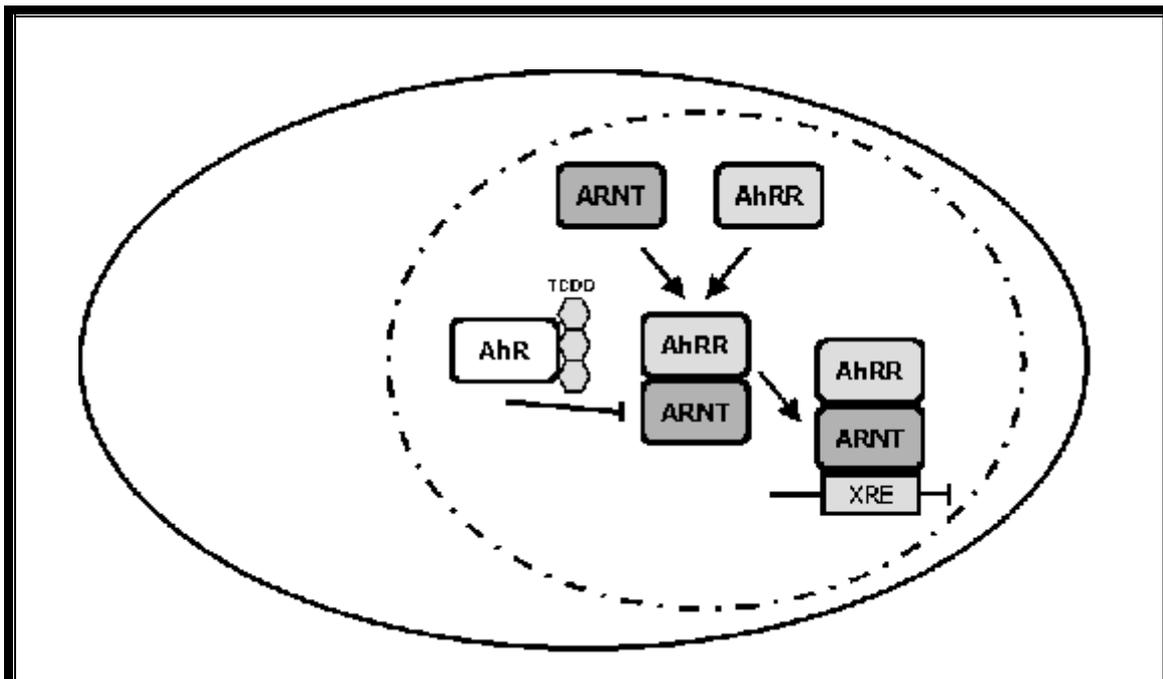


Abbildung 2: Schematische Darstellung der AhRR-Funktion: Der AhRR bildet im Zellkern ein Heterodimer mit Arnt. Dieses Heterodimer ist analog zum AhR-Arnt-Komplex in der Lage, an XRE zu binden. Dies führt zu einer Suppression der Expression von Zielgenen des AhR-Signalweges, was einer kompetitiven Inhibition entspricht, da dem AhR-Arnt-Komplex seine DNA-Bindungsstelle entzogen wird (Abkürzungen und Zitierweise siehe Text).

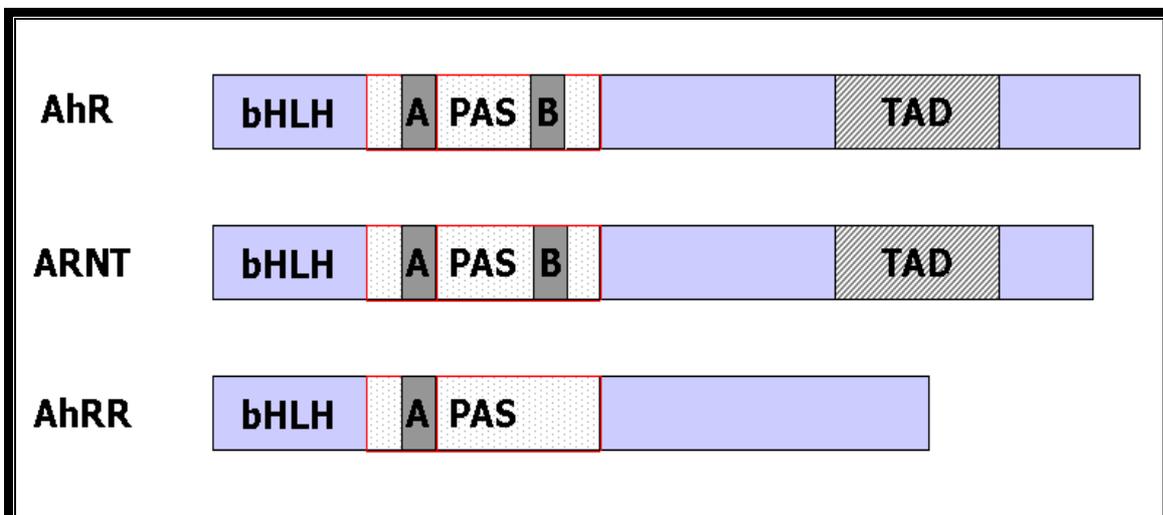


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von AhR, Arnt und AhRR. Es findet sich bei allen eine bHLH-Domäne am N-terminalen Ende zur DNA-Bindung und PAS-A-Domänen zur Heterodimerisierung. Im AhR und Arnt findet sich eine PAS-B-Domäne, die beim AhR zur Ligandenbindung verwendet wird. Die im AhR und Arnt enthaltene Transaktivierungsdomäne zur Rekrutierung von Polymerasen fehlt beim AhRR, so dass dieser nicht in der Lage ist, eine Transkription zu initiieren (Abkürzungen und Zitierweise siehe Text).

1.4. Mögliche Funktion des AhRR bei der Niederregulierung AhR-regulierter Gene

Die vermutete Funktion des AhRR ist bisher nur aus *in-vitro*-Daten mit Überexpression bekannt. In der Literatur ist bisher nicht beschrieben worden, dass nach Aktivierung der AhR-Signalkaskade durch AhR-Agonisten AhR-regulierte Gene wie CYP1A1 niederreguliert werden. Die De-Induktion scheint eher mit der Toxikokinetik der Substanzen korreliert zu sein. Andererseits zeigt sich, dass unter dem Einfluß inflammatorischer Zytokine die Expression AhR-regulierter Gene moduliert wird. So zeigen der Tumor-Nekrose-Faktor α , Lipopolysaccharid und Hypoxiebedingungen jeweils eine Niederregulierung der CYP1A1-Expression (Gharavi und El-Kadi, 2004; Fradette und du Souich, 2004).

TGF β (Transforming growth factor β) war das erste identifizierte Peptid einer Gruppe von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, der TGF β -Familie, die inzwischen mehr als 40 Faktoren umfasst (Attisano und Wrana, 1996). Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Proliferationsinhibition, der Apoptosepromotion und der Induktion von Zelldifferenzierungsprozessen (Puga et al., 2005). Dabei wird TGF β als parakrin wirkendes Zytokin von vielen Zelltypen in gebundener Form sezerniert und entfaltet seine Wirkung durch Rezeptorbindung und konsekutive Induktion einer Signalkaskade durch Rekrutierung von Smad-Transkriptionsfaktoren, die im Zellkern an Promotoren von Zielgenen binden und deren Expression regulieren (Döhr und Abel, 1997; Puga et al., 2005). Der AhR- und der TGF β -Signalweg zeigen dabei eine gegenseitige Beeinflussung. In AhR-Knockout-Mäusen finden sich erhöhte TGF β -Spiegel in der Leber in Verbindung mit einer erhöhten Apoptoserate der Hepatozyten und portaler Fibrose (Zaher et al., 1998). Die molekularen Mechanismen dieses Prozesses sind bis heute nicht bekannt (Puga et al., 2005). TGF β zeigt allerdings auch eine Wirkung auf die AhR-Regulation. In humanen A549-Lungenkarzinomzellen zeigte sich eine Inhibition der AhR-Expression und der Expression von Zielgenen des AhR-Signalweges wie CYP1A1 (Wolff et al., 2001). Dabei scheint die Inhibition der Zielgene unabhängig von der Inhibition der AhR-Expression zu sein, was einen TGF β -regulierten inhibierenden Faktor der AhR-Signaltransduktion vermuten ließ (Döhr et al., 1997).

Oncostatin M (OSM) ist ein Interleukin 6-Typ-Zytokin (IL6-Typ-Zytokin), das an der Regulation der Akut-Phase-Reaktion nach Infektion und Verletzung beteiligt ist, aber auch eine Rolle bei der Hämatopoese, der Leberregeneration und der Embryonalentwicklung spielt (Heinrich et al., 2003). Dabei führen sie in der Leber zu einer Verminderung der Aktivität von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen wie Cytochrom P450 Isoform 1A2 (CYP1A2), einem Zielgen der AhR-Signalkaskade, wobei der Mechanismus weitgehend unklar ist (Guillén et al., 1998; Hankinson, 2005).

1.5. Fragestellung und Ziele der Arbeit

1. Da die Promotersequenz des humanen Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressors bisher nicht bekannt ist, sollte diese Genregion mittels PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert werden.
2. Sequenzanalysen des Promoters sollten Aufschluss über seine grundsätzliche Struktur und Organisation sowie über putative Bindungselemente von Transkriptionsfaktoren geben. Ein besonderes Augenmerk galt dabei den XRE sowie dem Vergleich mit dem bereits bekannten Mausepromoter.
3. Die während der Sequenzanalyse gefundenen putativen Bindungselemente sollten in transienten Transfektionsstudien und konsekutiven Reporterassays auf ihre funktionelle Bedeutung hin überprüft werden. Dies sollte unter anderem auch die Gewebsspezifität der Aktivität berücksichtigen.
4. Die Responsivität des AhRR auf Promoterebene nach Behandlung mit Zytokinen wie Oncostatin M und Transforming growth factor β sollte überprüft werden und in den Zusammenhang der bisher bekannten Daten bezüglich der Regulation der AhR-Signalkaskade durch diese Zytokine eingeordnet werden.

2. Material

2.1. Geräte und Chemikalien

2.1.1. Geräte

Bunsenbrenner	Campinggaz
Elektrophorese-Spannungsgerät	ECPS 3000/150, Pharmacia
Inkubationsschrank	CO ₂ -Auto-Zero, Heraeus
Luminometer	LB 96 V, Berthold Technologies
Schüttelwasserbad	Infors
Spektrophotometer	DU 70, Beckman
Thermocycler	RoboCycler Gradient 40, Stratagene
	TRIO-Thermoblock, Biometra
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417-R, Eppendorf
UV-Photometer	Gene Quant II, Pharmacia
UV-Tisch mit Fotoapparat	Reprostar II, Camag
Vakuumpumpe	KNF Laboport
Waage	1204 MP, Sartorius
Wasserbad	Gesellschaft für Laborbedarf
Wasser-Deionisierung	Milli-Q, Millipore

2.1.2. Verbrauchsmaterial und Zubehör

Eppendorf-Reaktionsgefäße	1,5 ml und 2 ml, Eppendorf
Pasteur-Pipetten	Roth
Petrischalen	Ø 90 mm, Falcon
Pipettenspitzen	Eppendorf
Saran-Folie	Dow
Skalpell	Bayha
Well-Platten	6-Well-Platten, durchsichtig, steril, Falcon
	96-Well-Platten, weiß, nicht steril, Falcon
Zellkulturflaschen	Cellstar, 175 cm ² , 550 ml, Greiner Bio-one
Zell-Scraper	TPP
Zentrifugenröhrchen	15 ml und 50 ml, Falcon

2.1.3. Chemikalien

Agarose	Sigma
Benzo(a)pyren	Sigma
5x Bradford Reagent	Biorad
Borsäure	Merck
Bovines Serum-Albumin	Sigma
Dimethylsulfoxid	Sigma
Ethidium-Bromid	Sigma
KCl	Merck
β -Mercaptoethanol	Sigma
MgCl ₂	Merck
NaCl	Merck
Na ₂ EDTA	Sigma
NaOH	Merck
dNTPs 1,25 mM	Invitrogen
Oncostatin M	Sigma
Tetrahydrofuran	Sigma
Tris	ICN Biomedicals
Transforming growth factor β	Sigma

2.1.4. Lösungen und Puffer

10x TBE, pH 8,0	0,9 M Tris 0,9 M Borsäure 0,02 M EDTA Millipore-Wasser
6x-Ladepuffer DNA II	AppliChem
SMART Ladder Marker-DNA	Eurogentec

Alle nicht aufgeführten Lösungen und Puffer sind Bestandteil der unten genannten Kits.

2.1.5. Kits

SAWADY <i>Pwo</i> DNA Polymerase System	PeqLab
SuRE/Cut Buffer System	Roche
Restriktionsenzyme	Roche
Gel Extraction Kit	Qiagen
T4 DNA Ligase System	Roche
Plasmid Preparation Mini Kit	Qiagen
Plasmid Preparation Midi Kit	Qiagen
Fugene Transfektionssystem	Roche
Effectene Transfektionssystem	Qiagen
Dual Luciferase Reporter Assay System Kit	Promega

2.2. Biologisches Material

2.2.1. Plasmid-Vektoren

Für die Klonierung der Promoter-Fragmente wurde der pGL3-basic-Vektor (Promega) eingesetzt. Außerdem wurden die Vektoren pRLTK und pRL-SV40 (Promega) verwendet.

2.2.2. Bakterienkulturen

2.2.2.1. Bakterien

Für alle Transformationen wurden Epicurian coli XL-1 blue MRF´kan – Bakterien der Firma Stratagene eingesetzt.

2.2.2.2. Reagenzien für die Bakterienkulturen

Agar	Difco
Ampicillin	Sigma
Bacto-Trypton	Difco
Bacto-Yeast extract	Difco
D-(+)-Glucose	Sigma

2.2.2.3. Nähr- und Selektionsmedien für Bakterienkulturen

SOC-Medium

20 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Yeast extract und 0,5 g NaCl wurden in 900 ml MILLIPORE-Wasser gelöst. 2,5 ml 1 M KCL wurden hinzugegeben. Mit 10 M NaOH wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt, anschließend wurde der Ansatz mit MILLIPORE-Wasser auf 1000 ml aufgefüllt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Vor Gebrauch wurden 10 ml sterile 1 M MgCl₂-Lösung und 20 ml sterile 1 M Glucose-Lösung hinzugefügt.

LB-Medium, LB-Ampicillin-Medium und LB-Ampicillin-Agar

10 g Bacto-Tryptone, 5 g Bacto-Yeast extract and 10 g NaCl wurden in 900 ml MILLIPORE-Wasser aufgelöst. Der pH-Wert wurde mit 10 M NaOH-Lösung auf 7,0 eingestellt. Anschließend wurde der Ansatz mit MILLIPORE-Wasser auf 1000 ml aufgefüllt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Um LB-Ampicillin-Medium zu erhalten, wurde dem LB-Medium Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

Zur Herstellung von LB-Ampicillin-Agar wurde dem LB-Medium Agar in einer Konzentration von 7 g/l zugesetzt, anschließend wurde erneut autoklaviert. Unmittelbar vor dem Ausgießen des dann nicht mehr als handwarmen LB-Agars wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

2.2.3. Zellkulturen

2.2.3.1. Zelllinien

Für die Untersuchungen wurde die humane Lungenkarzinom- Zelllinie A549 und die humane Leberkarzinom-Zelllinie HepG2 eingesetzt.

2.2.3.2. Reagenzien für die Zellkultur

Accutase	PAA
Basal Medium Supplement	Seromed

DULBECCO´s Modified Eagles Medium	Sigma
+ 3,7 g/l NaHCO ₃	
+ 1,0 g/l D-Glucose	
ohne L-Glutamin	
DULBECCO´s Phosphate Buffered Saline	Sigma
+ 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin	
Fetales Kälberserum	PAA
L-Glutamin 200 mM	Gibco
Penicillin 1 U/ml	Gibco
Phosphate-Buffered Saline	Sigma
Streptomycin 1µg/ml	Gibco
WILLIAMS-Medium	Sigma

2.2.3.3. Nährmedien für die Zellkultur

A549-Zellen	DULBECCO´s Modified Eagles Medium, in 500ml: 2 mM L-Glutamin 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin
HepG2-Zellen	WILLIAMS-Medium, in 500ml: 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin

Beiden Medien wurden zusätzlich 10 % (v/v) Fetales Kälberserum oder 5 % (v/v) Basal Medium Supplement zugegeben.

3. Methoden

3.1. Polymerase-Ketten-Reaktionen

Für alle Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCRs) wurde das PeqLab SAWADY *Pwo*-DNA-Polymerase System verwendet. Die Durchführung der Reaktionen erfolgte in einem Stratagene Robocycler.

3.1.1. Primer

Alle Primer wurden mit dem Program „Primer3“ entworfen. Das Programm ist im Internet unter der Adresse http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi zugänglich.

Die Tabelle 2 zeigt die verwendeten Primer-Paare samt erwarteter Fragmentgröße, Annealing-Temperatur, Extensionszeit, Dimethylsulfoxid (DMSO)-Konzentration und Magnesium-Ionen (Mg^{2+})-Konzentration.

Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Primer-Paare in 5´-3´Sequenz mit Fragmentgröße sowie optimierter Annealing-Temperatur, Extensionszeit, DMSO-Konzentration und Magnesium-Ionen-Konzentration.

Primer	Sequenz	Fragmentgröße	Annealing-Temp.	Extensionszeit	DMSO-Konz.	Mg^{2+} -Konz.
hAhRR-Prom-Exon1	FW: TCATGTGGCCCCGTGTGTCC RW: GGCCCGCGTACGTGCACTC	784 bp	66° C	2 min.	2,5 %	1,5 mmol
hAhRR-Prom-Klon1	FW: TGCCTCTCGGAGTGACAGG RW: GGAGATCTTCTCGGCCTGGAAGACAAG	778 bp	54-66° C	2 min.	2,5 % oder 5 %	2,5 mmol
hAhRR-Promoter	FW: TCCCAGAATATGGTCTGTCTTGGCG RW: GCAGGGGCCTCCTCCGCTT	1858 bp	56° C	4 min.	2,5 %	2,5 mmol
hAhRR-Prom-Klon2	FW: TCCCAGAATATGGTCTGTCTTGGCG RW: CCCAAGCTTGGGCTCGGCCTGGAAGACAAG	1811 bp	66° C	4 min.	2,5 %	2,5 mmol

3.1.2. Durchführung der PCR-Reaktionen

Die PCR-Bedingungen wurden bezüglich Magnesium-Ionen-Konzentration, DMSO-Konzentration und Annealing-Temperatur optimiert (Tabelle 2). Die Extensionszeit wurde in

Abhängigkeit von der Größe der zu erwartenden PCR-Produkte festgelegt. Die einzelnen Reaktionen wurden in 50 µl Volumen angesetzt. Die initiale Denaturierung wurde für 5 min. bei 94°C durchgeführt. Die Zykluszahl war variabel. Die Post-Amplifikations-Extension wurde für 7 min. durchgeführt. Tabelle 3 zeigt die Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze.

Tabelle 3: Zusammensetzung der PCR-Reaktionen

Reaktionssubstanzen in der Ausgangskonz.	Endkonzentration	Vol. in 50 µl Ansatz
Dest. Wasser		ad 50µl
Reaktionspuffer (10x)	1x	5
MgSO ₄ 25mM	variabel	variabel
dNTPs 1.25 mM	0,2 mM	8
FW-Primer 4 mM	0,2 mM	2,5
RW-Primer 4 mM	0,2 mM	2,5
DMSO 50% (v/v)	variabel	variabel
Pwo-Polymerase 1 U/µl	0,025 U/µl	1,25
Template-DNA		5

3.2. Restriktionsreaktionen

Die Restriktionsreaktionen wurden mit dem SuRE/Cut Buffer System und den Restriktionsenzymen BamHI, BglII, HindIII, NheI, SacI und SmaI durchgeführt. Tabelle 4 gibt die verwendeten Puffer und die Inkubationszeiten zu den einzelnen Restriktionen an. Die Zusammensetzung der einzelnen Reaktionen folgte den Herstellerangaben der Firma ROCHE.

Tabelle 4: Puffer sowie Inkubationstemperatur und -zeiten der einzelnen Restriktionsreaktionen

Restriktionsenzym	Puffer	Inkubationstemperatur	Inkubationszeit
BamHI	B	37° C	2 h
BglII	B oder M	37° C	72 h
BglII/SacI	M	37° C	2 h
HindIII	B	37° C	16 h
NheI/HindIII	M	37° C	2 h
SmaI	A	25° C	16 h
TaqI	B	37° C	2 h

3.3. Gelelektrophorese

Für die Durchführung der Agarose-Gelelektrophoresen wurde Agarose in einer Konzentration von 0,9% und 1% (w/v) in TBE-Puffer eingesetzt. Die Gele enthielten Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,25 µg/ml. Jeweils 50 µl der DNA-Lösungen wurden mit 10 µl 6x-Ladepuffer DNA II versetzt und in die Taschen pipettiert. Zur Kontrolle der Bandengröße wurden 5µl der SMART Ladder Marker-DNA aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80mV. Das Elektrophorese-Ergebnis wurde dann unter einer UV-Lampe geprüft und zur Dokumentation fotografiert. Die DNA-Menge wurde semiquantitativ abgeschätzt.

3.4. DNA-Extraktion aus TBE-Agarose-Gelen

Die Platte des UV-Tisches wurde zur Vermeidung von Kontaminationen mit Saran-Folie abgedeckt und die Banden unter UV-Licht ausgeschnitten. Das weitere Procedere folgte dem

Protokoll des QIAGEN Gel Extraction Kits. Anschließend erfolgte eine Kontroll-Elektrophorese mit semiquantitativer Abschätzung der Ausbeute.

3.5. Sequenzierungen

Die Sequenzanalysen wurden von der Firma SRD Scientific Research and Development GmbH (Frankfurt) durchgeführt.

3.6. Ligation

Zur Klonierung der erhaltenen PCR-Fragmente in pGL3-basic-Vektoren wurde das T4 DNA Ligase System der Firma ROCHE verwendet. Das molare Verhältnis von Vektor-DNA zu Insert-DNA betrug 1:3 bis 1:6. Bei allen Ligationsansätzen wurden Kontroll-Ligationen (mit H₂O) durchgeführt, um mögliche Religationsreaktionen überprüfen zu können.

3.7. Transformation von Epicurian coli XL-1 blue MRF^rkan-Bakterien

Zur Vermehrung der in 3.6. gewonnenen Konstrukte wurden diese für Transformationen in Epicurian coli XL-1 blue MRF^rkan-Bakterien verwendet.

Die bei –80°C gelagerte Epicurian coli XL-1 blue MRF^rkan-Bakteriensuspension wurde auf Eis aufgetaut. Es wurden 100 µl der Bakteriensuspension in ein 15 ml-Reaktionsröhrchen gegeben und β-Mercaptoethanol (β-MSH) in einer Endkonzentration von 25 mM hinzugefügt. Die Suspension wurde für 10 min auf Eis inkubiert und mehrmals gemischt. Dann wurden 5 µl des Ligationsansatzes hinzupipettiert und für weitere 40 min im Eisbad inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 45 sec bei 42°C und danach eine Abkühlung für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 0,9 ml vorgewärmtem SOC-Medium (42°C) wurden die Proben für 1 h bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Danach wurden die Bakterienkulturen für 10 min. mit 3.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, die pelletierten Bakterien in 200 µl Medium resuspendiert und davon aliquote Mengen (50 µl, 100 µl oder 200 µl) auf LB-Ampicillin-Agar ausplattiert.

3.8. Plasmid-Präparationen

Die Plasmid-Präparationen wurden mit dem Plasmid Preparation Mini Kit und dem Plasmid Preparation Midi Kit von QIAGEN durchgeführt. Die Plasmidausbeute wurde anschließend photometrisch bestimmt.

3.9. Transfektionen und Behandlungen von A549- und HepG2-Zellen

Die Transfektionsstudien wurden entweder mit dem ROCHE Fugene System oder mit dem QIAGEN Effectene System durchgeführt.

3.9.1. Zellanzucht

3.9.1.1. Zellanzucht von A549-Zellen

Die A549-Zellen wurden in 25 ml DULBECCO´s Modified Eagles Medium (DMEM) + 10% Fetales Kälberserum (FCS) (v/v) + 2 mM L-Glutamin + 0,01 U/ml Penicillin/Streptomycin (DMEM/FCS) in belüfteten Zellkulturflaschen im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre herangezogen. Es entwickelte sich ein adhärenter Zell-Layer, dessen Wachstum mikroskopisch kontrolliert wurde. Erreichte das Zellwachstum annähernd die Konfluenz, wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums und zweimaligem Waschen mit 15 ml Phosphate Buffered Saline (PBS) mittels 3,5ml Accutase-Inkubation für 5min bei 37° C von der Flaschenwand abgelöst. Nach anschließender Zugabe von 10ml Medium wurden die Zellen durch Pipettieren vereinzelt. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.9.1.2. Zellanzucht von HepG2-Zellen

Die Kultivierung der HepG2-Zellen erfolgte analog der Zellanzucht der A549-Zellen. Das Medium war WILLIAMS-Medium + 10% FCS (v/v) + 0,01 U/ml Penicillin/Streptomycin (WILLIAMS/FCS).

3.9.2. Transfektionen

3.9.2.1. Transfektionen von A549-Zellen

Diese Transfektionen wurden mit A549-Zellen und dem Fugene System (ROCHE) in 6-Well-Platten durchgeführt. Es wurden pro Well 1µg Vektor-DNA und 0,5µg oder 1µg Kontroll-Vektor-DNA (pRLTK) transfiziert.

Dazu wurden 1×10^5 Zellen pro Well in 3 ml DMEM/FCS ausgesät und für 24 h im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und durch 2 ml DMEM/FCS pro Well ersetzt. Nachfolgend wurden die Transfektionslösungen hinzupipettiert. Bei jedem Versuch blieb ein Well zur Kontrolle untransfiziert.

Pro Well wurden 100 µl der Transfektionslösungen eingesetzt. Zur Herstellung wurden 3 µl Fugene Transfektionsreagenz pro 100 µl Transfektionslösung mit DMEM-Medium + 5% Basal Medium Supplement (v/v) + 0,01 U/ml Penicillin/Streptomycin (DMEM/BMS) gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Vektor-DNA hinzugegeben. Tabelle 5 zeigt die Zusammensetzung der Transfektionslösung für ein Well.

Die Well-Platten wurden anschließend für 8 h im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Danach wurde das Medium mit der Transfektionslösung abgenommen und durch 2 ml frisches DMEM/FCS pro Well ersetzt.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Transfektionslösung für ein Well für Transfektionen von A549-Zellen. Der pGL3-basic-Vektor lag in einer Konzentration von 0,8 µg/µl vor, der pGL3b-hAhRR-Prom-770-Vektor in einer Konzentration von 0,12 µg/µl und der pGL3b-hAhRR-Prom-1.8-Vektor in einer Konzentration von 0,22 µg/µl.

Substanzen	µl pro Well
DMEM/BMS	ad 100 µl
1µg Vektor-DNA	variabel
pRLTK-Vektor 1,2 µg/µl	0,83 µl (1 µg) oder 0,5 µl (ca. 0,5 µg)
Fugene	3 µl
gesamt	100

3.9.2.2. Transfektionen von HepG2-Zellen

Die HepG2-Zellen wurden mit dem Effectene System (QIAGEN) in 6-Well-Platten transfiziert.

Die Durchführung erfolgte analog zur Transfektion der A549-Zellen. Allerdings wurden aufgrund der geringeren Wachstumsgeschwindigkeit der HepG2-Zellen 2×10^5 Zellen pro Well ausgesät. Ferner wurde WILLIAMS-Medium mit 10 % FCS (v/v) oder 5 % BMS (v/v) verwendet.

Es wurden pro Well 1µg Vektor-DNA transfiziert. Als Kontrollvektor zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden 0,5 µg pro Well des pRLTK-Vektors oder 1 µg pro Well eines pRL-SV40-Vektors verwendet.

Die Herstellung der Transfektionslösungen folgte dem QIAGEN Effectene System-Protokoll. Tabelle 6 zeigt die Zusammensetzung der Transfektionslösung für ein Well.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Transfektionslösung für ein Well zur Transfektion von HepG2-Zellen. Der pGL3-basic-Vektor lag in einer Konzentration von 0,8 µg/µl vor, der pGL3b-hAhRR-Prom-770-Vektor in einer Konzentration von 0,12 µg/µl und der pGL3b-hAhRR-Prom-1.8-Vektor in einer Konzentration von 0,22 µg/µl.

Substanzen	µl pro Well
EC-Puffer	100
1µg Vektor-DNA	variabel
0,5 oder 1µ Kontroll-Vektor-DNA	variabel
Enhancer (1 mg/ml)	2
Effectene (1 mg/ml)	4
WILLIAMS/BMS	600
gesamt	ca. 700

3.9.3. Behandlung von transfizierten Zellen

8 h nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit BaP, TGFβ und OSM behandelt. Tabelle 7 gibt eine Übersicht der Substanzen, mit denen behandelt wurde, einschließlich Endkonzentration, Lösemittel, Kontrollsubstanz und Behandlungszeit.

Tabelle 7: Behandlungssubstanzen mit Endkonzentration, Lösungsmittel, Kontrollsubstanz und Behandlungszeit.

Substanz	Endkonzentration	Lösemittel	Kontrollsubstanz	Bahndlungszeit
Benzo(a)pyren	5 μ M, 10 μ M	Tetrahydrofuran	Tetrahydrofuran	16 h und 24 h
Transforming growth factor β	10 pM		leer	24 h
Oncostatin M	10 ng/ml		leer	24 h

3.9.4. Ernte der Zellen

24 h nach Beginn der Behandlung wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und mit 250 μ l 1x Passive Lysis Buffer (Dual Luciferase Reporter Assay Kit, Promega) pro Well versetzt. Nach Inkubation für 5 min bei 37°C wurden die noch adhärenen Zellen mit einem Zell-Scraper abgekratzt und in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die so gewonnenen Zell-Lysate wurden bei 4°C mit 20.000 g für 20 min. zentrifugiert und aliquote Mengen der Überstände für die luminometrische Bestimmung der Luciferase-Aktivität und die photometrische Proteinbestimmung eingesetzt.

3.10. Luminometrische Bestimmung der Luciferase-Aktivität

Das Prinzip des Reporter-gen-Assays basiert auf der meßbaren, regulierten Expression eines Fremdgenes wie der Luciferase. Dabei ist es bei dem Dual Luciferase Reporter Assay möglich, zwei unterschiedliche Luciferase-Aktivitäten aus einer Probe zu bestimmen. Neben der Bestimmung der Aktivität des eigentlichen, regulierten Reportergens, in unserem Fall der Firefly-Luciferase, die im leicht alkalischen Milieu arbeitet und deren Substrat das Lucigenin ist, kann auch die Aktivität der nicht regulierten Renilla-Luciferase, deren Substrat Coelenterazin ist, des kotransfizierten Kontroll-Vektors bestimmt werden. Dies ermöglicht, die Firefly-Aktivität bezüglich der Transfektionseffizienz zu korrigieren.

Jeweils 20 µl der Überstände der einzelnen Zell-Lysate der Transfektionsversuche wurden in 96-Well-Platten pipettiert. Die Bestimmung der Luciferase-Aktivitäten erfolgte mit dem Dual Luciferase Reporter Assay System Kit der Firma Promega in einem LB 96 V-Luminometer der Firma Berthold Technologies. Dabei wurden pro Well 75 µl der Substrate der beiden Luciferasen sequentiell eingesetzt und die Lumineszenz für jeweils 30 sec gemessen.

Zur Korrektur der Transfektionseffizienz wurde die Firefly-Aktivität durch die Renilla-Aktivität geteilt. Die Messwerte wurden als relative Aktivität pro mg Protein angegeben.

3.11. Photometrische Bestimmungen

3.11.1. Photometrische Bestimmung von Plasmid-DNA-Konzentrationen

Die Bestimmung der Plasmid-Konzentration erfolgte durch photometrische Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm. Eine optische Dichte von 1 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

3.11.2. Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die photometrische Bestimmung von Protein-Konzentrationen wurde nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) mit dem BIORAD 5x Bradford Reagent und einem DU 70-Spektrophotometer der Firma Beckman durchgeführt.

Das BIORAD Bradford Reagent 5x wurde mit MILLIPORE-Wasser im Verhältnis 1:5 verdünnt, um in Arbeitskonzentration vorzuliegen.

PROMEGA Passive Lysis Buffer 5x wurde im Verhältnis 1:5 mit MILLIPORE-Wasser verdünnt, um als Passive Lysis Buffer 1x vorzuliegen.

Zur Bestimmung wurden 20 µl der Proben bzw. der Standards mit 1 ml 1x Bradford-Reagent versetzt, für 20 min. inkubiert und die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Konzentration der Proben wurde mittels einer Standarddeichkurve ermittelt. Als Proteinstandard wurde Bovines Serum-Albumin in einer Konzentration von 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml und 400 µg/ml verwendet. Dazu wurden entsprechende Mengen des Bovinen Serum-Albumins in 1x Passive Lysis Buffer (Dual Luciferase Reporter Assay-Kit, Promega) gelöst.

3.12. Elektronische Datenverarbeitung und Statistik

3.12.1. Sequenzanalysen

Die Daten aus der Sequenzanalyse wurden auf der Internetplattform HUSAR mit der Adresse <http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz/> (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) ausgewertet. Mittels des Programms PileUp wurden Sequenzvergleiche (Alignments) mit den publizierten Daten der NCBI-Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bezüglich des humanen Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressors (Gen-Nummer NM_020731) und des murinen Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressors (Gen-Nummer NM_009644) durchgeführt. Restriktionskarten wurden unter Verwendung der Programme MapSort und MapPilot erstellt.

Die Suche nach putativen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren erfolgte mit dem Transcription Element Search System (TESS), das sich im Internet unter der Adresse <http://www.cbil.upenn.edu/tess> finden läßt.

3.12.2. Statistik

Aus den Daten der luminometrischen Messung wurden Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Anschließend wurde die statistische Signifikanz mittels des Student´s T-Tests ($p < 0,05$) ermittelt.

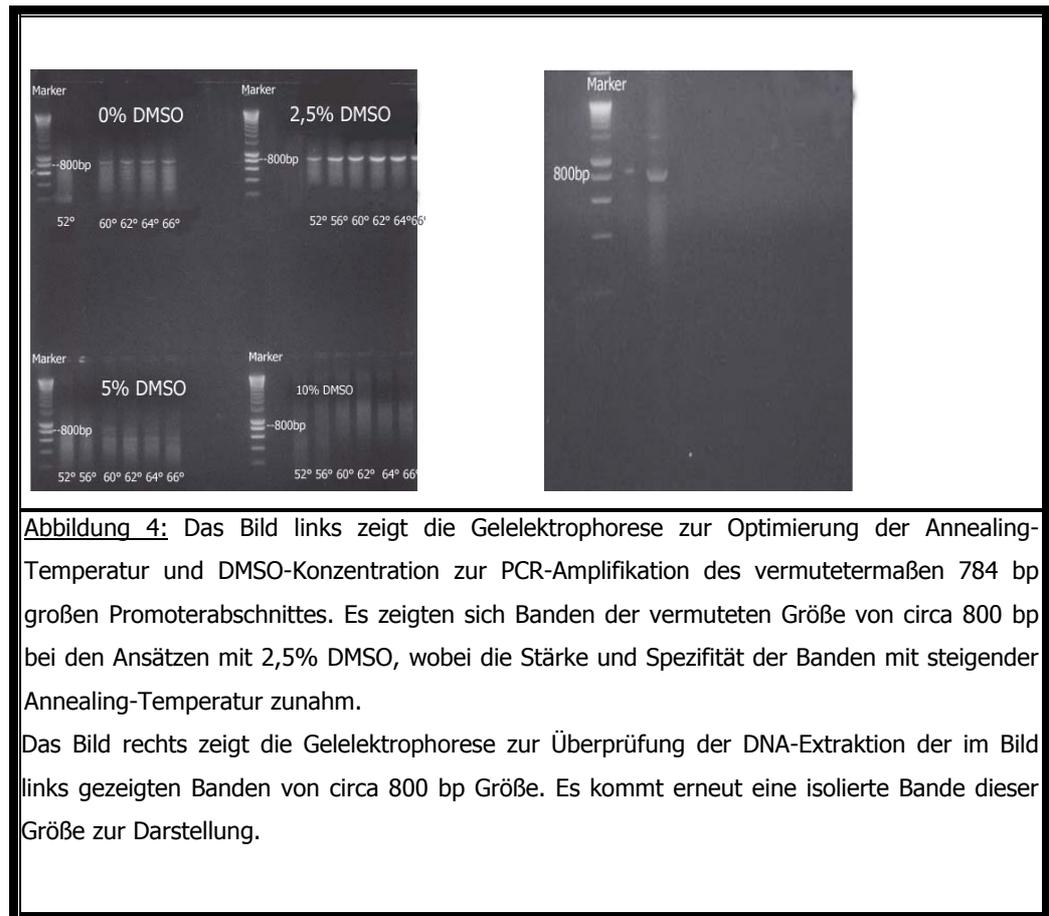
4. Ergebnisse

4.1. Polymerase-Ketten-Reaktionen und Klonierung

4.1.1. PCR und Klonierung des 800 bp – Fragmentes des Promoters

4.1.1.1. PCR des 800 bp – Fragmentes des Promoters

Sequenzvorlage für die Auswahl der Primer war die 5'-aufwärts gelegene Region des Gens des humanen Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressors aus der NCBI-Datenbank (Gen-Nummer NM_020731). Da für die codierende Region des Gens gesicherte Sequenzdaten vorlagen, wurde die Lage der Primer so gewählt, dass sich nur der Sense-Primer in der Promoterregion befand, der Antisense-Primer aber in der Region des Exon 1 der codierenden Region. Als Template-DNA diente humane genomische DNA. Es sollte ein Produkt einer Größe von 784 bp amplifiziert werden. Erste Versuche ergaben unspezifische Amplifikationsreaktionen. Deshalb war es notwendig, die PCR-Bedingungen zu optimieren. Die PCR wurde durchgeführt, um die Annealing-Temperatur der Primer und die DMSO-Konzentration im PCR-Ansatz zu optimieren. Eine Zugabe von DMSO erschien aufgrund des GC-Reichtums des zu erwartenden Fragmentes sinnvoll, um die Annealing-Temperatur der Primer im zu amplifizierenden Teil zu erniedrigen. Eine gelelektrophoretische Analyse der PCR-Reaktionen mit einer DMSO-Konzentration von 0 %, 2,5 %, 5 % und 10 % und unterschiedlichen Annealing-Temperaturen von 52° C, 56° C, 60° C, 62° C, 64° C und 66° C wurde durchgeführt und ist in Abbildung 4 dargestellt. Es zeigten sich deutliche Banden von circa 800 bp bei den Ansätzen mit 2,5% DMSO, wobei die Stärke und Spezifität der Banden mit steigender Annealing-Temperatur zunahm. Die Bandenintensität war am stärksten bei 66° C und 2,5 % DMSO. Schwache Banden konnten aber auch bei einer PCR ohne DMSO gefunden werden. Bei 5 % und 10 % DMSO konnten keine spezifischen Banden gefunden werden. Die Banden der Ansätze mit 2,5 % DMSO, die mit einer Annealing-Temperatur von 60°C, 62°C, 64°C und 66°C amplifiziert wurden, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt, um für eine Reamplifikation als Template-DNA zur Verfügung zu stehen. Die Aufreinigung wurde gelelektrophoretisch überprüft und ihr Ergebnis ist ebenfalls in Abbildung 4 dargestellt. Dabei zeigte sich eine Bande der erwarteten Fragmentgröße.



Anschließend wurde die $MgSO_4$ -Konzentration in Abhängigkeit von der Annealing-Temperatur optimiert. Als Template-DNA diente humane genomische DNA. Die DMSO-Konzentration betrug 2,5 %, die $MgSO_4$ -Konzentrationen betragen bei diesem Versuch 1,5 mM, 2 mM, 3 mM und 4 mM. Es zeigten sich Banden der erwarteten Größe bei $MgSO_4$ -Konzentrationen von 1,5 mM und 2 mM, wobei die stärksten Banden bei einer Konzentration von 1,5 mM zu finden waren. Bei einer $MgSO_4$ -Konzentration von 3 mM und 4 mM zeigten sich unspezifische Amplifikationen. Die Stärke der Banden nahm mit sinkender Annealing-Temperatur zu, wobei allerdings unspezifische Banden auftraten. Deshalb schien eine Annealing-Temperatur von 66°C bei einer $MgSO_4$ -Konzentration von 1,5 mM und einer DMSO-Konzentration von 2,5 % für die Amplifikation mit diesen Primern am geeignetsten. Abbildung 5 zeigt die Optimierung von $MgSO_4$ -Konzentration und Annealing-Temperatur bei einer DMSO-Konzentration von 2,5 %. In Anlehnung an diese Ergebnisse wurde eine Reamplifikation des gereinigten PCR-Produktes durchgeführt, um über genügend Ausgangsmaterial für die weiteren Versuche zu verfügen. Die Banden wurden ausgeschnitten und gereinigt, das Ergebnis der Aufreinigung wurde gelelektrophoretisch überprüft und ist ebenfalls in Abbildung 5 dargestellt. Es zeigt sich eine kräftige Bande der entsprechenden Größe.

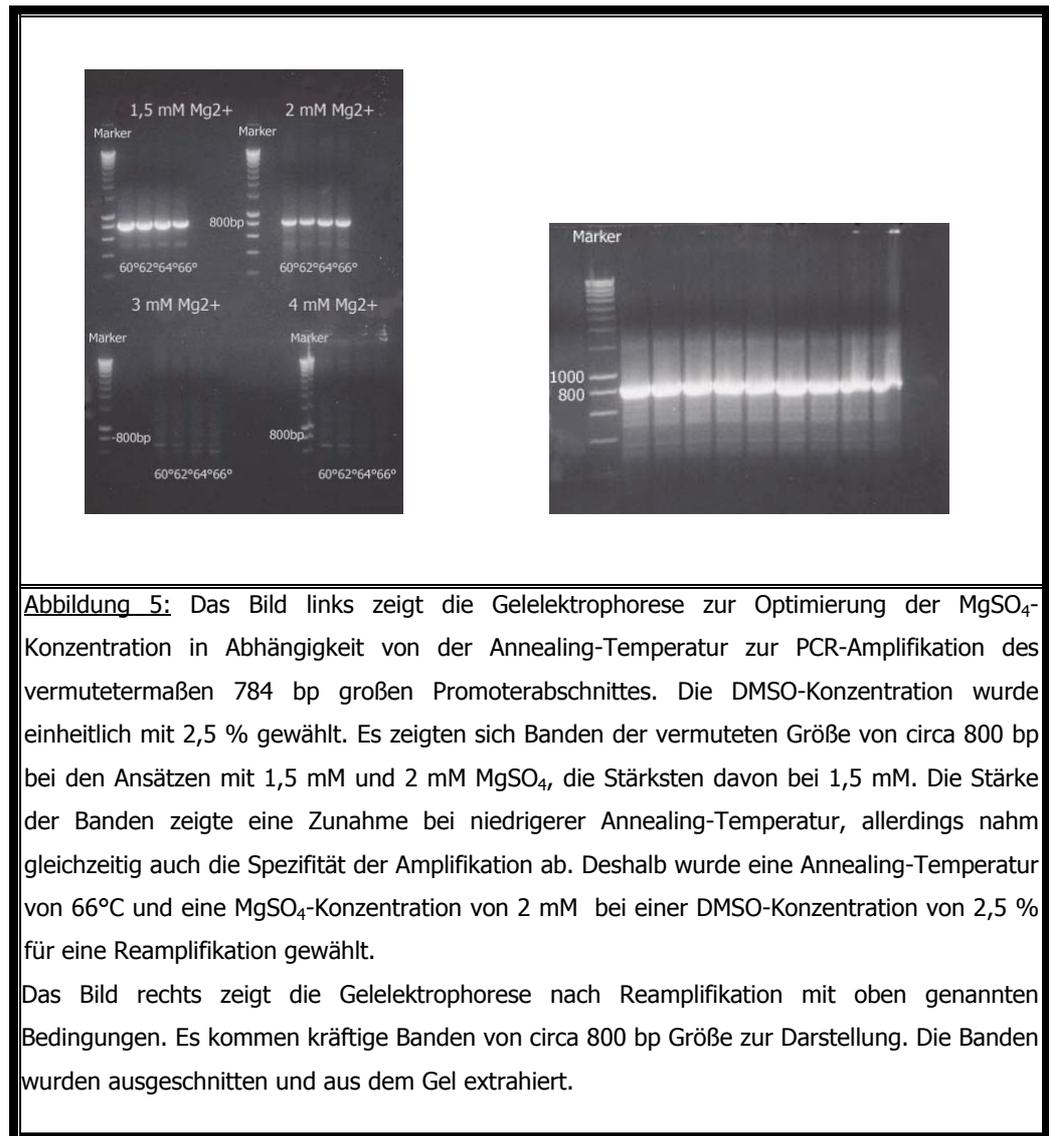
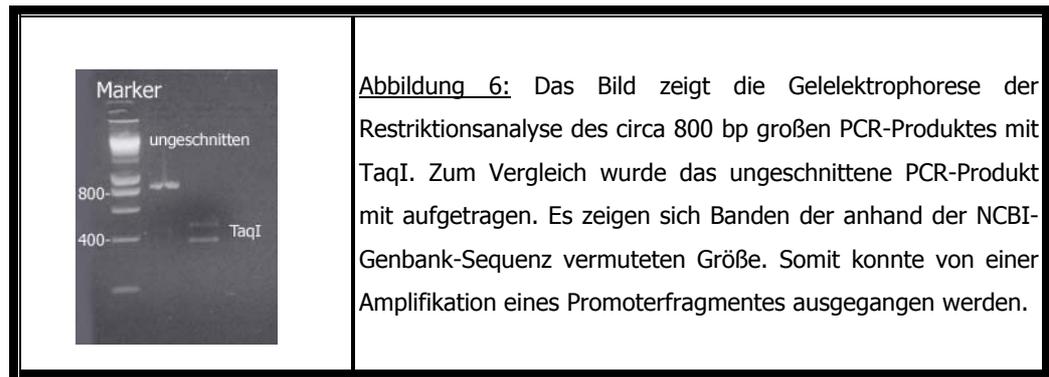


Abbildung 5: Das Bild links zeigt die Gelelektrophorese zur Optimierung der MgSO₄-Konzentration in Abhängigkeit von der Annealing-Temperatur zur PCR-Amplifikation des vermutetermaßen 784 bp großen Promoterabschnittes. Die DMSO-Konzentration wurde einheitlich mit 2,5 % gewählt. Es zeigten sich Banden der vermuteten Größe von circa 800 bp bei den Ansätzen mit 1,5 mM und 2 mM MgSO₄, die Stärksten davon bei 1,5 mM. Die Stärke der Banden zeigte eine Zunahme bei niedrigerer Annealing-Temperatur, allerdings nahm gleichzeitig auch die Spezifität der Amplifikation ab. Deshalb wurde eine Annealing-Temperatur von 66°C und eine MgSO₄-Konzentration von 2 mM bei einer DMSO-Konzentration von 2,5 % für eine Reamplifikation gewählt.

Das Bild rechts zeigt die Gelelektrophorese nach Reamplifikation mit oben genannten Bedingungen. Es kommen kräftige Banden von circa 800 bp Größe zur Darstellung. Die Banden wurden ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert.

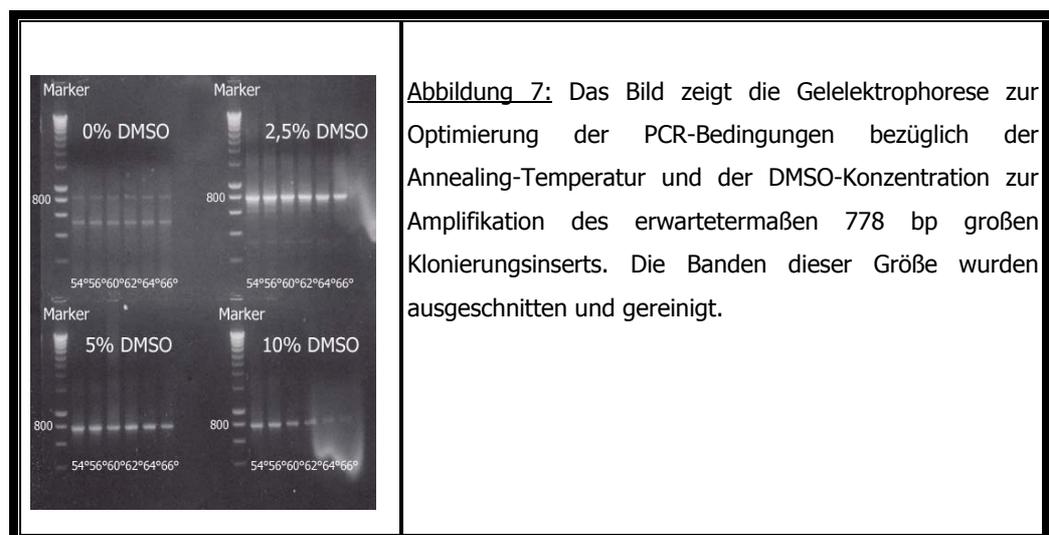
Das gereinigte PCR-Produkt wurde einer Restriktionsanalyse mit dem Enzym TaqI zugeführt, den Sequenzdaten folgend wurden bei diesem Verdau zwei Fragmente einer Größe von 371 und 413 bp erwartet. Die Restriktion wurde gelelektrophoretisch mit einem 1%igen Gel analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt. Die Restriktion ergab zwei Banden der erwarteten Größe als Hinweis darauf, dass ein Promoterfragment amplifiziert wurde. Daraufhin wurde das PCR-Produkt sequenziert.



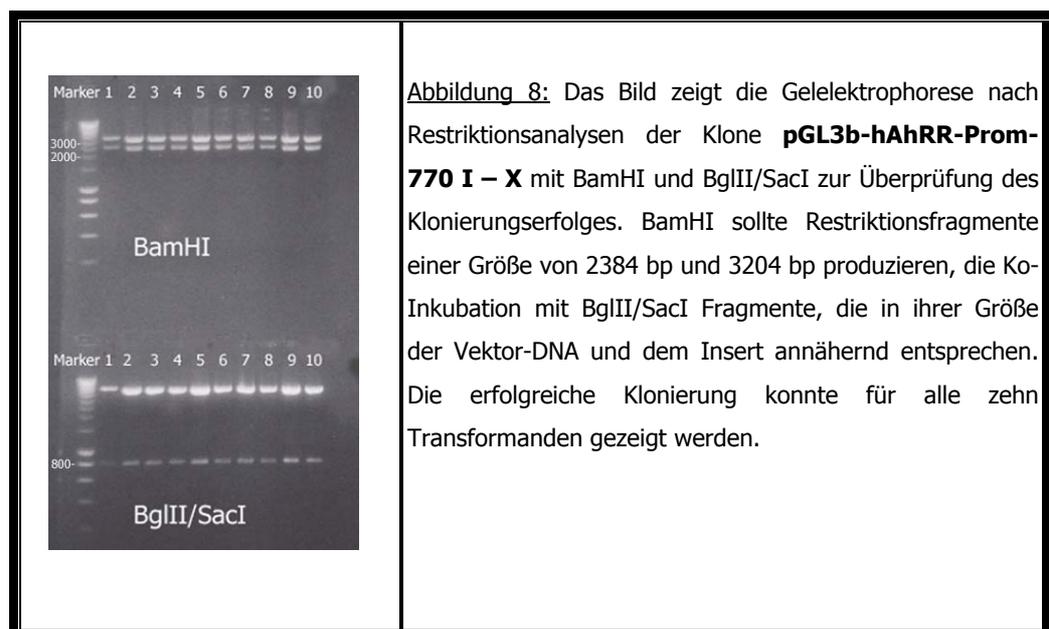
4.1.1.2. Klonierung des 800 bp-Promoterabschnitts

Für die Klonierung des Promoterfragmentes war es erforderlich, Restriktionsschnittstellen einzufügen. Die Primer wurden so gewählt, dass die Exon 1-Anteile eliminiert wurden und gleichzeitig eine BglII-Schnittstelle eingefügt wurde. Es sollte ein Produkt von 778 bp amplifiziert werden. Wiederum wurden die PCR-Bedingungen bezüglich Annealing-Temperatur und DMSO-Konzentration optimiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

Unter allen Reaktionsbedingungen zeigten sich Banden der erwarteten Größe. Die Spezifität der Amplifikation nahm mit steigender DMSO-Konzentration zu, die Intensität nahm mit steigender Annealing-Temperatur ab.



Um eine gerichtete Klonierung des PCR-Produktes zu erreichen, wurde der pGL3-basic-Vektor nacheinander mit den Restriktionsenzymen SmaI und BglII verdaut und gelelektrophoretisch gereinigt. Das amplifizierte Promoterfragment wurde mit BglII verdaut. SmaI führt dabei zu einem blunt-end-Verdau, während eine Restriktion mit BglII überhängende Enden liefert. Im Anschluss wurde Vektor-DNA und Insert-DNA ligiert und in Bakterien transformiert. Es konnten zehn Kolonien gefunden werden, die isoliert und in Suspensionskultur vermehrt wurden. Aus den Kulturen wurden die Plasmide mittels Plasmidpräparation isoliert. Die Klone wurden pGL3b-hAhRR-Prom-770 I – X genannt. Um die Klonierung zu bestätigen, wurden alle zehn Klone mit BamHI und in einer Ko-Inkubation mit SacI und BglII verdaut. Für den BamHI-Verdau wurden bei einer erfolgreichen Klonierung zwei Restriktionsfragmente einer Größe von 2384 bp und 3204 bp erwartet, weil sowohl Vektor als auch Insert eine diesbezügliche Schnittstelle enthalten. BglII und SacI schneiden erhalten gebliebene, das Insert flankierende Restriktionsschnittstellen der Multiple-Cloning-Site. Bei einer erfolgreichen Klonierung sollten zwei Fragmente entstehen, die in ihrer Größe der Vektor- und der Insert-DNA annähernd entsprechen. Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse dieser Restriktionsanalysen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Nach Verdau mit BamHI sind alle zehn Klone in der erwarteten Fragmentgröße positiv. Der SacI-/BglII-Verdau zeigt ein Fragment von 800 bp. Somit wurde das Promoterfragment erfolgreich kloniert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde für weitere Versuche verwendet.



4.1.2. PCR und Klonierung des 1.8 kbp – Fragmentes des Promoters

4.1.2.1. PCR des 1.8 kbp – Fragmentes des Promoters

Um mehr Hinweise auf putative Bindungselemente gewinnen zu können, wurde in den folgenden Experimenten ein 1.800 bp großes Promoterfragment kloniert. Das Primer-Design wurde wieder so gewählt, dass der Antisense-Primer im Bereich des Exon 1 lag. Der Sense-Primer lag in einem Bereich von –1.800 bp. Auch bei diesen Versuchen wurden die PCR-Bedingungen hinsichtlich der DMSO-Konzentration und der Annealing-Temperatur optimiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt. Die gelelektrophoretische Auftrennung zeigte eine schwache Bande der erwarteten Größe bei der mit 2,5% DMSO und einer Annealing-Temperatur von 56°C durchgeführten Reaktion. Diese Bande wurde ausgeschnitten, gereinigt und reamplifiziert. Dieses Ergebnis ist ebenfalls in Abbildung 9 dargestellt. Es zeigten sich kräftige Banden der erwarteten Größe, allerdings waren unspezifische Amplifikationen deutlich sichtbar. Das Produkt wurde aus dem Gel isoliert und für die Klonierung eingesetzt.

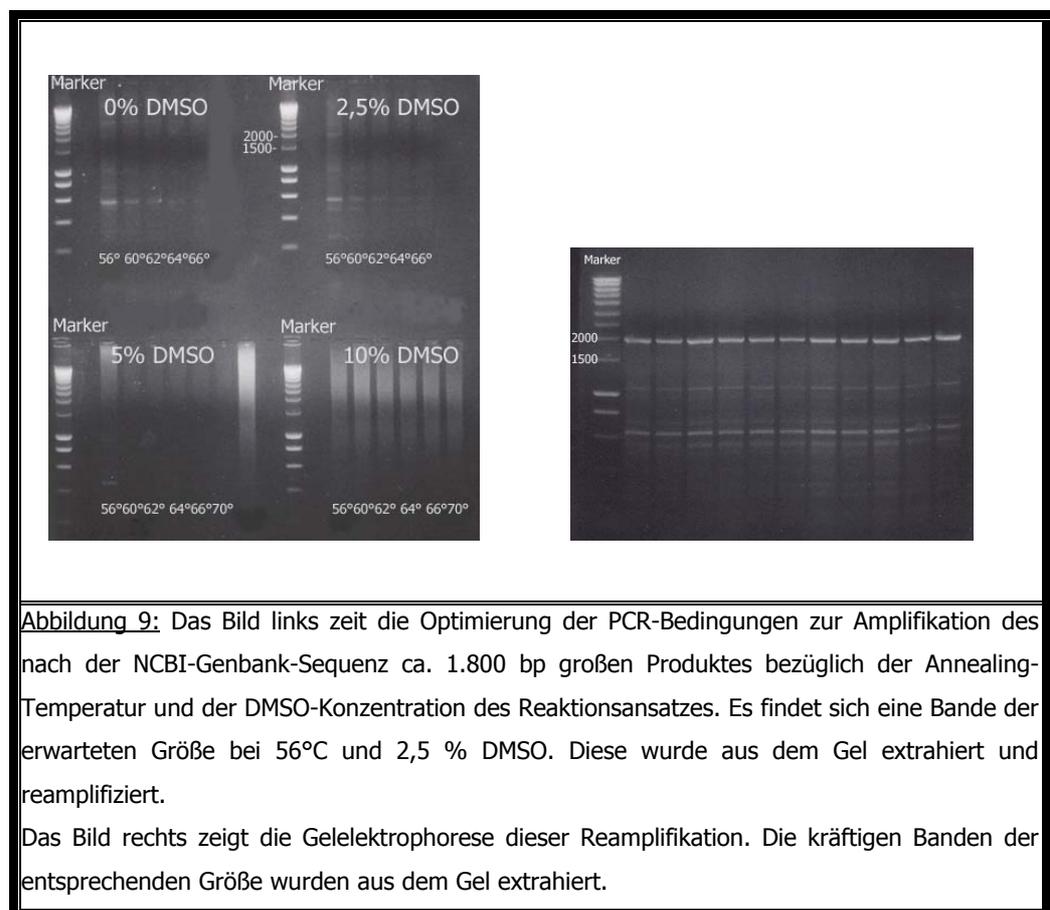
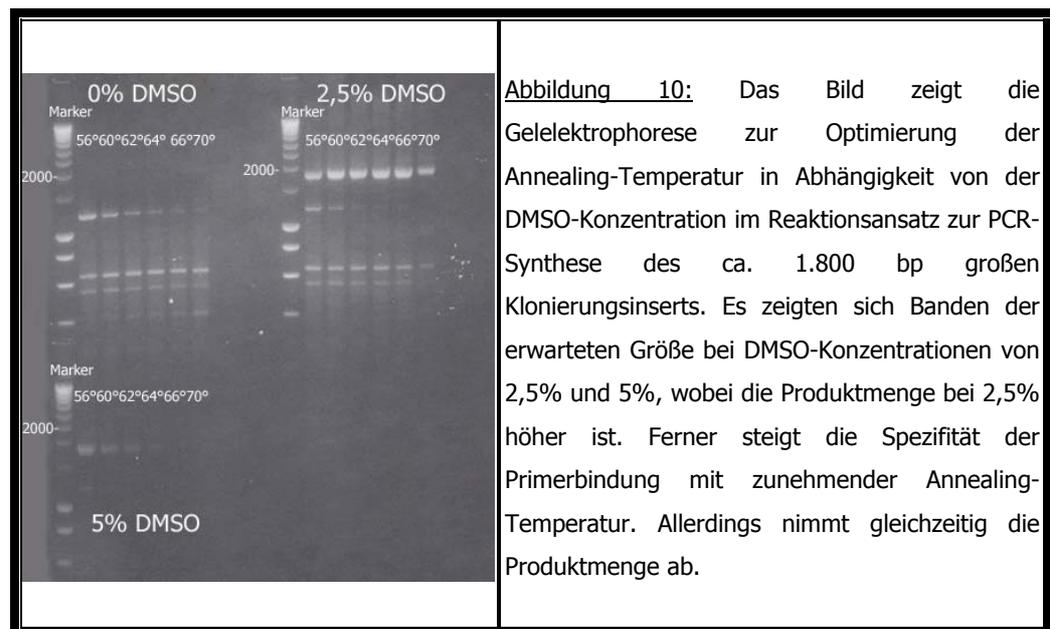


Abbildung 9: Das Bild links zeigt die Optimierung der PCR-Bedingungen zur Amplifikation des nach der NCBI-Genbank-Sequenz ca. 1.800 bp großen Produktes bezüglich der Annealing-Temperatur und der DMSO-Konzentration des Reaktionsansatzes. Es findet sich eine Bande der erwarteten Größe bei 56°C und 2,5 % DMSO. Diese wurde aus dem Gel extrahiert und reamplifiziert.

Das Bild rechts zeigt die Gelelektrophorese dieser Reamplifikation. Die kräftigen Banden der entsprechenden Größe wurden aus dem Gel extrahiert.

4.1.2.2. Klonierung des 1.8 kbp – Fragmentes des Promoters

Um auch für dieses Produkt eine gerichtete Klonierung zu ermöglichen, wurden wieder Restriktionsschnittstellen mittels PCR eingefügt. Diesmal wurde eine selektive HindIII-Schnittstelle eingefügt. In Anlehnung an die bereits beschriebenen Experimente wurden die PCR-Bedingungen bezüglich DMSO-Konzentration und Annealing-Temperatur optimiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt. Das Bild zeigt Banden der erwarteten Größe bei den Reaktionen mit 2,5 % und 5 % DMSO im Reaktionsansatz, wobei die Spezifität der Primerbindung bei 5 % DMSO besser war. Die Menge des erwarteten Produktes war allerdings deutlich geringer. Bei den Ansätzen mit 2,5% DMSO steigt die Spezifität der Primerbindung mit zunehmender Annealing-Temperatur. Da allerdings bei 70°C Annealing-Temperatur die Produktmenge geringer zu sein scheint als bei 66°C, wurde 66°C als geeignete Annealing-Temperatur für die Reamplifikation ausgewählt.

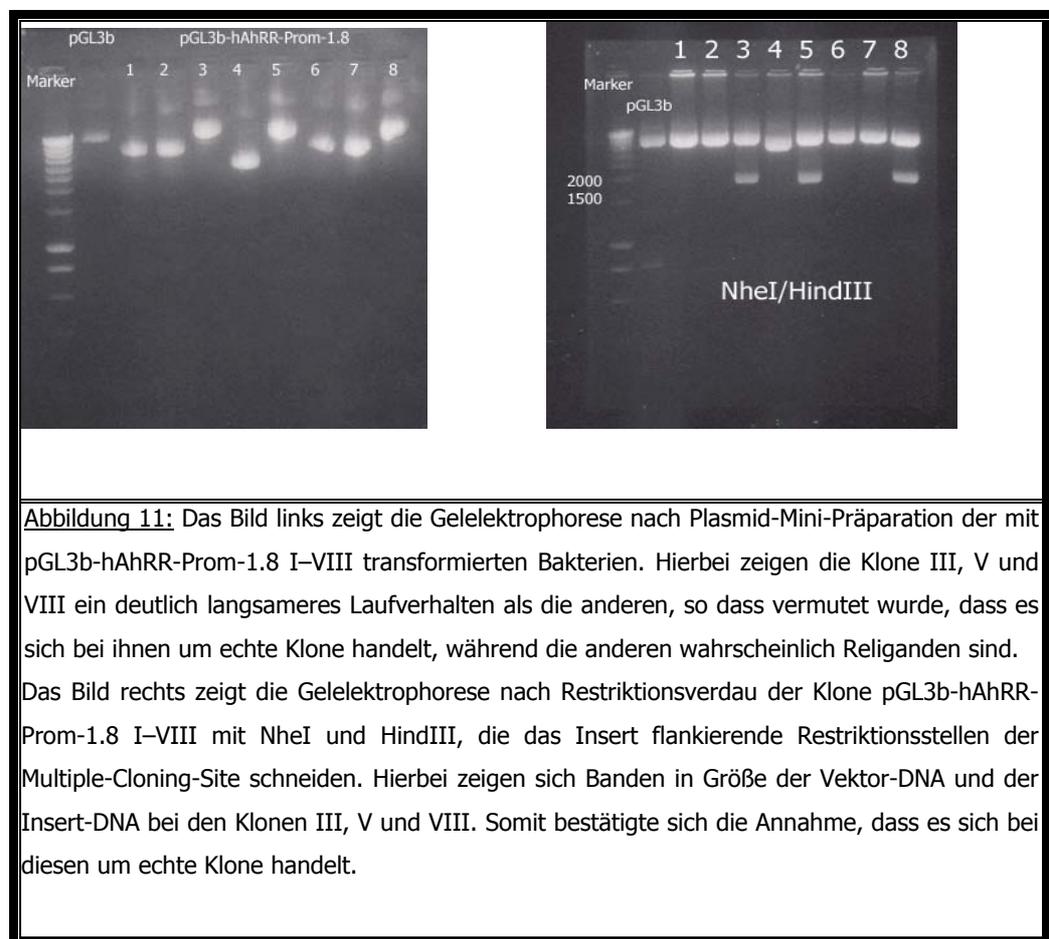


Für die Klonierung wurde das isolierte Produkt mit HindIII verdaut und über ein 0,9%iges Gel gereinigt.

Ebenso wurde der pGL3-basic-Vektor zur Vorbereitung auf die Klonierung nacheinander mit SmaI und mit HindIII verdaut, über ein 0,9%iges Gel aufgereinigt und isoliert. Nach erfolgter Ligation wurde die Plasmid-DNA in Bakterien transformiert und Bakterien-Kolonien auf Agar-Platten über Nacht angezogen.

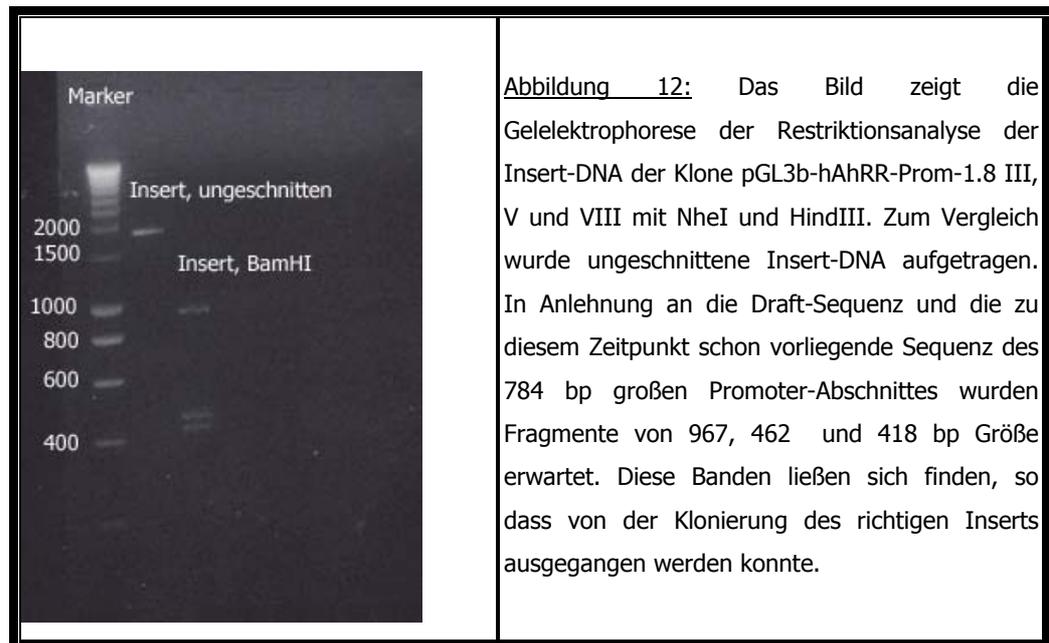
Die acht gewachsenen Kolonien wurden in Suspensionskultur vermehrt und die Plasmid-DNA isoliert. Die entsprechenden Klone wurden pGL3b-hAhRR-Prom-1.8 I–VIII genannt.

Wie Abbildung 11 zeigt, haben die Klone III, V und VIII eine deutlich höhere Molekülgröße. Diese hatte im Vergleich zum Leervektor um circa 2.000 bp zugenommen. Deshalb wurde vermutet, dass die Klone III, V und VIII das entsprechende Insert enthalten. Um dies zu bestätigen, wurden Restriktionsanalysen mit NheI und Hind III durchgeführt. Diese Enzyme schneiden das Insert aus der Multiple-Cloning-Site des Vektors. Abbildung 11 zeigt, dass nach Behandlung der Plasmid-DNA mit NheI und HindIII lediglich bei den Klonen III, V und VIII Banden der erwarteten Größe auftreten.



Die Klone III, V und VIII wurden amplifiziert und das Insert mit NheI und HindIII ausgeschnitten und isoliert. Zur weiteren Verifizierung der Befunde wurde das Insert mit BamHI geschnitten, weil die Sequenzdaten auf zwei BamHI-sensitive Schnittstellen hinwiesen. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 12. Das ungeschnittene Insert zeigt eine Größe

von circa 1.800 bp. Nach BamHI-Verdau traten Banden einer Größe von 967, 462 und 418 bp auf. Das isolierte Plasmid wurde erneut sequenziert.



4.2. Sequenzanalysen

Die Ergebnisse der Sequenzanalysen sind in Tabelle 8 dargestellt. Es konnten 1.803 bp des Promoters von -1 bis -1.803 sequenziert werden. Die Sequenz des kürzeren Fragmentes ist bis auf eine Folge von 37 bp vollständig in dem größeren Fragment enthalten. Der AhRR-Promoter enthält keine TATAA- und CAAT-Boxen, was auf multiple Transkriptions-Initiations-Stellen hinweist. In den ersten 400 Basen (-1 bis -400) scheinen sich mehrere GC-reiche Regionen mit insgesamt vier putativen Sp1-Bindungsstellen an den Positionen -127 bis -139, -186 bis -195, -205 bis -217 und -356 bis -365 zu befinden (Tabl. 8).

Besonders auffallend sind acht repetitive Elemente von 35 bp bis 37 bp Länge von -408 bis -700 (Tabl. 8). Die zusätzlichen 37 bp des kürzeren Fragmentes würden dabei einem zusätzlichen 37 bp langen repetitiven Element an Stelle -408 entsprechen. Ferner ließen sich innerhalb der repetitiven Elemente vier putative E-Box-Elemente als Hinweis auf eine Interaktion mit Arnt finden. Drei davon hatten die Sequenz CACAT, eines die Sequenz CACGT (Tabl. 8).

Sequenzvergleiche mit den publizierten Daten der NCBI-Genbank bezüglich des humanen und murinen Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressors wurden durchgeführt (Tabl. 8). Dabei

zeigte sich beim Vergleich mit der humanen Sequenz eine Identität von >99%. Lediglich zwei Transitionen von Thymin der Promotersequenz zu Cytosin der Genbanksequenz an Position -415 und Cytosin der Promotersequenz zu Thymin der Genbanksequenz an Position -494 ließen sich finden. Beim Vergleich mit der Maus-Sequenz ergab sich nur eine Identität von 45%.

Die Suche nach putativen Bindungselementen innerhalb der Promotersequenz zeigte drei putative XRE-Sequenzen an den Positionen -216 bis -221, -406 bis -411 und -1.288 bis -1.294. Alle hatten die Sequenz GCGTGA (Tabl. 8).

Auch vier putative Interleukin 6-Typ-Zytokin-responsive Elemente (IL6-RE) ließen sich in der Promotersequenz identifizieren. Diese lagen im Bereich von -1.803 bis -1.798 mit der Sequenz TCCCAG, im Bereich -1.445 bis -1.440 mit der Sequenz CTGGGA, im Bereich -1.208 bis -1.203 mit der Sequenz CTGGGA und im Bereich -932 bis -927 mit der Sequenz TCCCAG (Tabl. 8).

1.8 kbp Promoter	-1.500	AAAGAATATACCTTTTTGTC	TCTGGTGATATTCCTTG TTC	TGAAGTCTTCTTTGTCTGGG	ACTCATA CAGCTGCTTCATT	TGATTAACGTTTG CATGTTG
NCBI-Genbank	-1.500	AAAGAATATACCTTTTTGTC	TCTGGTGATATTCCTTG TTC	TGAAGTCTTCTTTGTCTGGG	ACTCATA CAGCTGCTTCATT	TGATTAACGTTTG CATGTTG
					IL6-RE	
1.8 kbp Promoter	-1.400	TATCTTTTCTATCCATTTA	CTTTATCTACCTAAGTCTTT	ACAGTCCAAGTGGATCCATG	ACACATTTCTGACATTTT TA	TGGCACTTTCCACACAAGGT
NCBI-Genbank	-1.400	TATCTTTTCTATCCATTTA	CTTTATCTACCTAAGTCTTT	ACAGTCCAAGTGGATCCATG	ACACATTTCTGACATTTT TA	TGGCACTTTCCACACAAGGT
1.8 kbp Promoter	-1.300	GGATATGCGTGAGTCTGCC	TCCTCTTCCAGGCTACACTC	ACTTCAGGTCAGGTGAGGGC	TCCTTAACTTCCTCCCAAG	GCTTCTGGCCCAGAGCCTGG
NCBI-Genbank	-1.300	GGATATGCGTGAGTCTGCC	TCCTCTTCCAGGCTACACTC	ACTTCAGGTCAGGTGAGGGC	TCCTTAACTTCCTCCCAAG	GCTTCTGGCCCAGAGCCTGG
					XRE	
1.8 kbp Promoter	-1.200	CACGGGATGGTTACTGCACA	CAGGTCTGCAGAACGTTTGT	GAGGGCTCAGCTGCACCCAT	TGCAAGGAAAATCAAGATTC	TGTGAGAAGAAGGGTGATGC
NCBI-Genbank	-1.200	CACGGGATGGTTACTGCACA	CAGGTCTGCAGAACGTTTGT	GAGGGCTCAGCTGCACCCAT	TGCAAGGAAAATCAAGATTC	TGTGAGAAGAAGGGTGATGC
1.8 kbp Promoter	-1.100	CCTCTCTGAGGTGGGTGGCA	GGCAAGCTGACCAGCCTGGG	CACAGATACTGGGCTGCTCC	TCAGGGGCCCGCTGGGAGG	CACATGCCTGTGTCCAGCAC
NCBI-Genbank	-1.100	CCTCTCTGAGGTGGGTGGCA	GGCAAGCTGACCAGCCTGGG	CACAGATACTGGGCTGCTCC	TCAGGGGCCCGCTGGGAGG	CACATGCCTGTGTCCAGCAC
					IL6-RE	

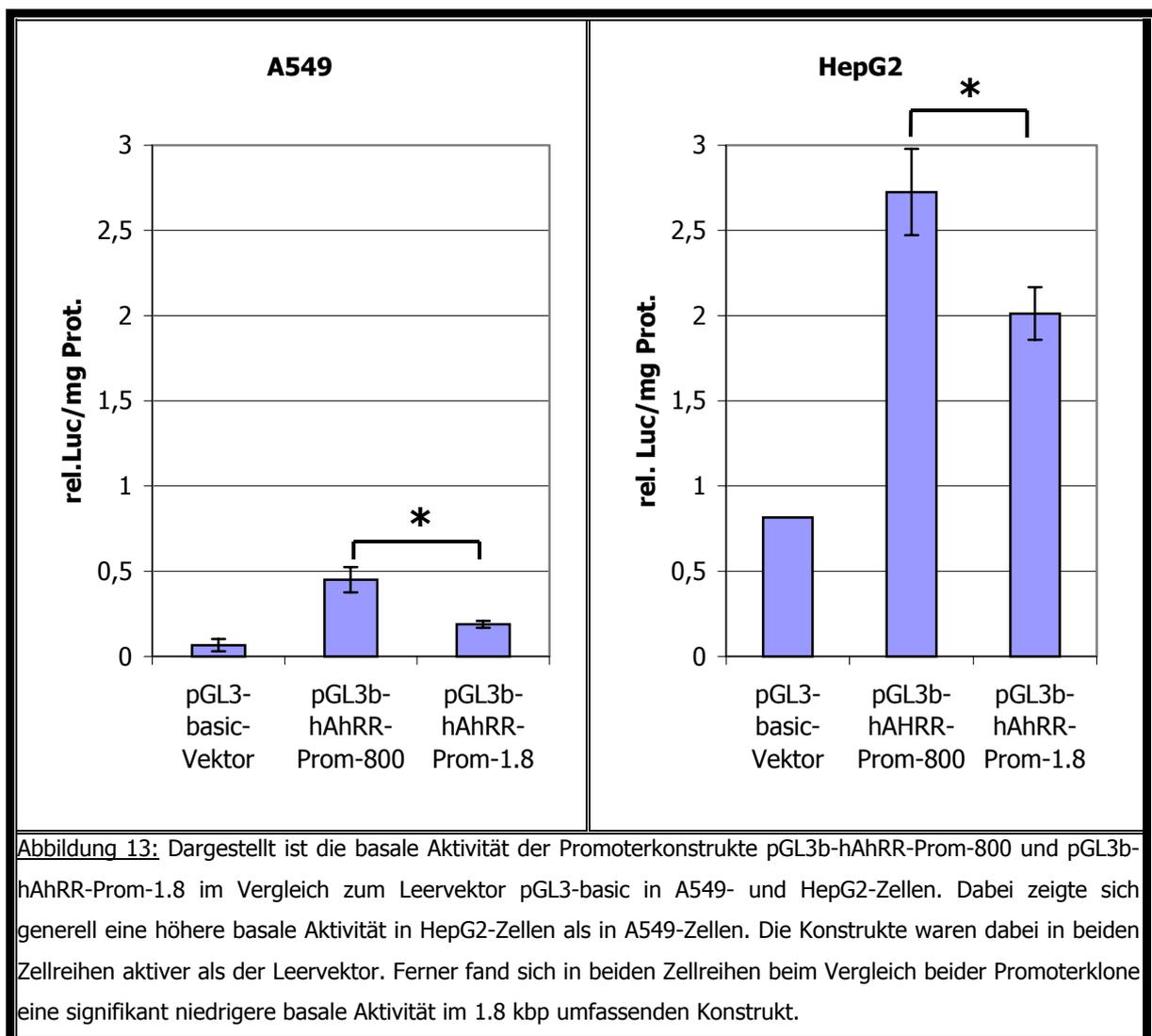
1.8 kbp Promoter	-1.000	TGTTGGTGGCAGCTGGTGGG	TGTAGTCAGCTGGACTCAGG	GCGCTGTGAGCTAGTGACTT	AAGTGAATCCCAGGACTGT	AGAGTGGAGTAGAATTTTAC
NCBI-Genbank	-1.000	TGTTGGTGGCAGCTGGTGGG	TGTAGTCAGCTGGACTCAGG	GCGCTGTGAGCTAGTGACTT	AAGTGAATCCCAGGACTGT	AGAGTGGAGTAGAATTTTAC
					<u>IL6-RE</u>	
1.8 kbp Promoter	-900	ATAGAAAAGAGGAAGCCTGT	TGGCCCAAAGCACAAGGCTA	TCAAGGGCAGAGATGAGAAG	AGCAAGACCTGCCACAAACC	GCACAGGGAGATCACACCAC
NCBI-Genbank	-900	ATAGAAAAGAGGAAGCCTGT	TGGCCCAAAGCACAAGGCTA	TCAAGGGCAGAGATGAGAAG	AGCAAGACCTGCCACAAACC	GCACAGGGAGATCACACCAC
1.8 kbp Promoter	-800	AGAGAGGAGATTATGCTGTT	GCCCTGCATGCGCTCTTGGG	GGTGATGGGATCATGTGGCC	CCGTGTGTCCTCTCGGAGTG	ACAGGAACATGGGACCTGAG
NCBI-Genbank	-800	AGAGAGGAGATTATGCTGTT	GCCCTGCATGCGCTCTTGGG	GGTGATGGGATCATGTGGCC	CCGTGTGTCCTCTCGGAGTG	ACAGGAACATGGGACCTGAG
1.8 kbp Promoter	-700	TACCCTCTCAGAGGTGACAG	AAACACGGGACCCACATAC	CTTCTCGGGGTGACAGGAAC	ACGGGACCCACATACCTTT	TCGGGGTGACGTGAACACAG
NCBI-Genbank	-700	TACCCTCTCAGAGGTGACAG	AAACACGGGACCCACATAC	CTTCTCGGGGTGACAGGAAC	ACGGGACCCACATACCTTT	TCGGGGTGACGTGAACACAG
		Repeat 8	E-Box	Repeat 7		Repeat 6
1.8 kbp Promoter	-600	AACCCACATACCCTCTCAG	GGGTGACAGGAACGTGGGAC	CCCACGTACCTTCTCGGGGT	GATGGGAACACGGGACCCGC	GTACCCTCTTGGGGTGACG
NCBI-Genbank	-600	AACCCACATACCCTCTCAG	GGGTGACAGGAACGTGGGAC	CCCACGTACCTTCTCGGGGT	GATGGGAACACGGGACCCGC	GTACCCTCTTGGGGTGACG
		E-Box	Repeat 5	E-Box	Repeat 4	Repeat 3

1.8 kbp Promoter	-500	GGAACACGGGACCCACATA	CCTTCTCGGGGTGACGGGA	ACACGGGACCCCGCTACCT	TCTCGGGGTGACGGGAACA	CGGGATCCCGCTGACGAGT
NCBI-Genbank	-500	GGAACATGGGACCCACATA	CCTTCTCGGGGTGACGGGA	ACACGGGACCCCGCTACCT	TCTCGGGGTGACGGGAACA	CGGGACCCCGCTGACGAGT
		----- ----- Repeat 2		----- ----- Repeat 1		----- -----
		E-Box				XRE
1.8 kbp Promoter	-400	GTTTGGAGGCTGCAGGCTGC	CCAGGCCTGGCTGCGCCCC	GCCCCGCCGTTCTGGCTT	CCTCGATGGCTTCTCTCTCA	GGACGCCGTCTCCCGCCAC
NCBI-Genbank	-400	GTTTGGAGGCTGCAGGCTGC	CCAGGCCTGGCTGCGCCCC	GCCCCGCCGTTCTGGCTT	CCTCGATGGCTTCTCTCTCA	GGACGCCGTCTCCCGCCAC
		 Sp1			
1.8 kbp Promoter	-300	GGCGCCTGAGCCAGGCTCC	AGAGCAGGCGCTTCTCTGG	GGGAGCCGGGACCCGCTG	ACACCGAGGGGAGGCCAGG	CGTGACCCGGCCCCGGTGGC
NCBI-Genbank	-300	GGCGCCTGAGCCAGGCTCC	AGAGCAGGCGCTTCTCTGG	GGGAGCCGGGACCCGCTG	ACACCGAGGGGAGGCCAGG	CGTGACCCGGCCCCGGTGGC
					----- XRE Sp1
1.8 kbp Promoter	-200	TCCTCGGTGCGGGTGCTGG	AGAGCAGGGTCCCGGGCCA	GGGGTCCACGAGGAGGAG	CAGGAGGTGGGGCCTCGCG	GGGTCGCGGGTGTGGGGCG
NCBI-Genbank	-200	TCCTCGGTGCGGGTGCTGG	AGAGCAGGGTCCCGGGCCA	GGGGTCCACGAGGAGGAG	CAGGAGGTGGGGCCTCGCG	GGGTCGCGGGTGTGGGGCG
	 Sp1		 Sp1	
1.8 kbp Promoter	-100	CCAGGACCGCGCTGAGGGGC	CCGGGCATCGCGCGGGAA	CAGGGCGCACGTGGCGGTT	CCGGTGACCGGGTGCCCCCT	TGTCTCCAGGCCGAGCCCA
NCBI-Genbank	-100	CCAGGACCGCGCTGAGGGGC	CCGGGCATCGCGCGGGAA	CAGGGCGCACGTGGCGGTT	CCGGTGACCGGGTGCCCCCT	TGTCTCCAGGCCGAGGACG

4.3. Transfektionsstudien

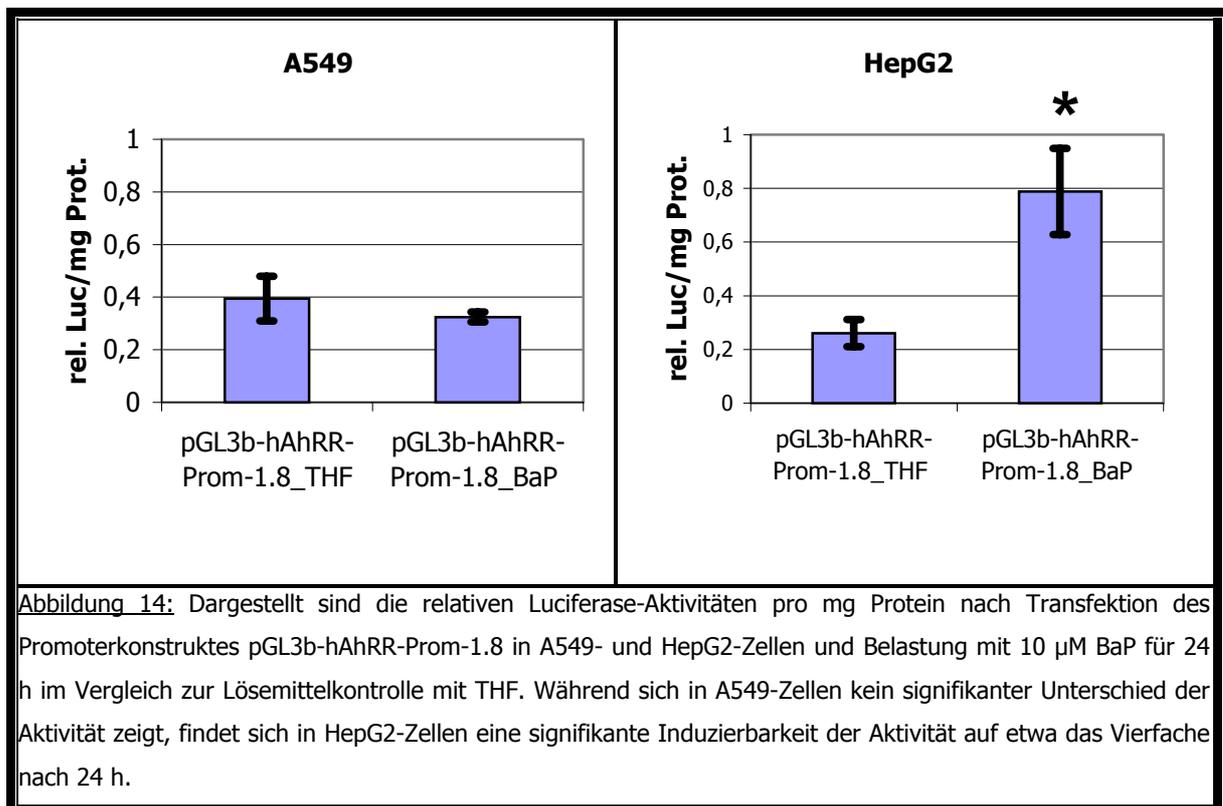
4.3.1. Basale Aktivität der Promoterkonstrukte in A549- und HepG2-Zellen

Um die basale Aktivität der klonierten Promoterkonstrukte zu prüfen, wurden der Leervektor pGL3-basic und die Konstrukte pGL3b-hAhRR-Prom-800 und pGL3b-hAhRR-Prom-1.8 in A549-Zellen und HepG2-Zellen transfiziert und die relative Luciferase-Aktivität pro mg Protein nach 24 h Inkubation bestimmt. Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse. Dabei fanden sich insgesamt höhere basale Aktivitäten in HepG2-Zellen als in A549-Zellen. Sowohl in A549-Zellen wie in HepG2-Zellen zeigten die Promoterkonstrukte höhere Aktivitäten als der Leervektor. Zudem ließ sich im Vergleich beider Promoterkonstrukte sowohl für A549-Zellen wie für HepG2-Zellen eine signifikant niedrigere basale Aktivität für das längere Konstrukt zeigen.



4.3.2. BaP-Responsivität der Promoterkonstrukte in A549- und HepG2-Zellen

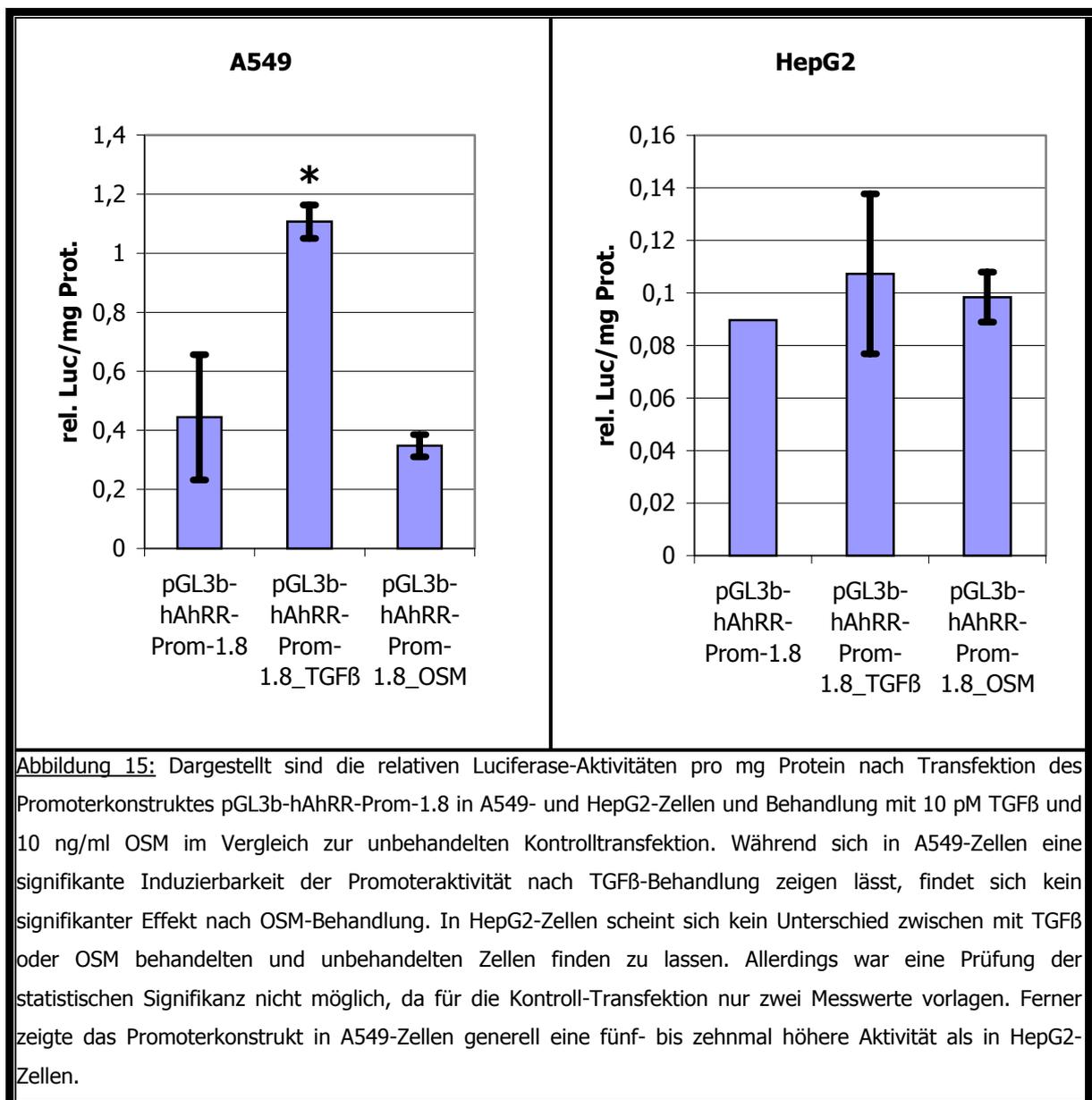
Belastungsstudien mit BaP in transfizierten A549- und HepG2-Zellen wurden durchgeführt, um die funktionelle Aktivität der gefundenen putativen XRE zu prüfen. Dazu wurde das Promoterkonstrukt pGL3b-hAhRR-Prom-1.8 in die Zelllinien transfiziert und diese für 24 h mit BaP in einer Endkonzentration von 10 μ M belastet. Als Belastungskontrolle diente THF, das Lösemittel des BaP. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Während sich in A549-Zellen kein signifikanter Unterschied zwischen der Aktivität der belasteten Zellen und der Lösemittel-Kontrolle finden lässt, zeigen die HepG2-Zellen eine auf etwa das Vierfache erhöhte Aktivität nach 24 h Belastung mit BaP. Die Aktivitäten der Kontrollen befanden sich in den beiden Zellreihen auf ähnlichem Niveau.



4.3.3. TGF β - und OSM-Responsivität der Promoterkonstrukte in A549-Zellen und HepG2-Zellen

Um zu prüfen, ob das klonierte Promoterfragment des pGL3b-hAhRR-Prom-1.8-Konstruktes eine Responsivität bezüglich TGF β und OSM nach Transfektion in A549- und HepG2-Zellen

zeigt, wurden die Zellen für 24 h mit genannten Substanzen behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. TGF β lag dabei in einer Endkonzentration von 10 pM vor und OSM in einer Endkonzentration von 10 ng/ml. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt. In A549-Zellen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Aktivität nach Behandlung mit TGF β , während die OSM-Behandlung keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle zeigte. Dagegen scheinen sich in HepG2-Zellen keine Unterschiede zur Kontrolltransfektion nach Behandlung mit TGF β und OSM finden zu lassen. Eine statistische Signifikanzprüfung konnte allerdings nicht durchgeführt werden, da für die Kontrolltransfektion nur zwei Werte vorlagen. Auffallend war beim Vergleich der beiden Versuche zudem, dass die Aktivitäten des in A549-Zellen transfizierten Vektors generell etwa fünf- bis zehnfach höher ausfielen als die des in HepG2-Zellen transfizierten Vektors.



5. Diskussion

Ziel meiner Arbeit war die Klonierung und Sequenzierung der Promoterregion des humanen Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressors. Es gelang, zwei Promoterkonstrukte zu generieren, die sich über etwa 800 bp und 1.800 bp stromaufwärts des ATG des Exon 1 erstreckten. Im Anschluss wurde die funktionelle Bedeutung des Promoters in Luciferase-Reporter-Gen-Assays mit diesen klonierten Promoterabschnitten überprüft.

5.1. TATAA- und CAAT-Box-freier Promoter, Sp1-Bindungsstellen

Eine erste Sequenzanalyse zeigte ein vollständiges Fehlen von TATAA- und CAAT-Boxen. TATAA- und CAAT-Boxen stellen DNA-Sequenzelemente vieler Säugetier-Gene dar, an die ihre respektiven Transkriptionsfaktoren binden und so die Transkription regulieren (Javahery et al., 1994; Gronostajski, 2000). Dagegen ließ sich in dem sequenzierten Promoterabschnitt des AhRR ein ausgeprägter GC-Reichtum mit vier putativen Sp1-Bindungsstellen finden. Dies sind GC-reiche Sequenzelemente in Promoterregionen von Genen, an die der Sp1-Transkriptionsfaktor bindet (Torigoe et al., 2003). Über eine Rekrutierung von TATAA-bindendem Protein kommt es zu einem Transkriptionsstart in TATAA-freien Promotoren (Black et al., 2001). Sp1 war der erste identifizierte Transkriptionsfaktor einer Gruppe von Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren, die Sp1-ähnlichen Transkriptionsfaktoren, die via Sp1-Bindungsstellen in Promotern die Transkription regulieren (Cook et al.; 1999). Sp1 ist beteiligt an der konstitutiven Transkription von Genen mit TATAA-Box-freien Promotoren (Black et al., 2001). Darüber hinaus erfolgt eine post-translationale Phosphorylierung und Glykosylierung von Sp1, welche die Aktivität des Transkriptionsfaktors reguliert (Black et al., 1999). Auch konnte eine Beteiligung von Sp1-ähnlichen Transkriptionsfaktoren an der gewebsspezifischen Expression von Genen nachgewiesen werden (Philipsen und Suske, 1999). Vor diesem Hintergrund vermute ich bei den gefundenen Sp1-sites eine Bedeutung bezüglich der basalen Expression. Eine Bindung von Sp1 an die Sp1-Bindungsstellen des murinen Promoters sowie die Bedeutung dieser DNA-Elemente für die konstitutive Expression konnten bereits gezeigt werden (Baba et al., 2003). Möglicherweise ist auch die bekannte unterschiedliche Expression des AhRR in verschiedenen humanen Geweben (Tsuchiya et al., 2003) durch Sp1-Transkriptionsfaktoren mitbedingt.

5.2. Xenobiotika-Responsive-Elemente und BaP-induzierte Expression

Die weitere Sequenzanalyse zeigte drei putative Xenobiotika-Responsive-Elemente. Dies sind Enhancer-Sequenzen der regulierenden Genabschnitte 5'-stromaufwärts des codierenden Bereichs von AhR/Arnt-regulierten Genen, an die die AhR/Arnt-Heterodimere spezifisch binden und so die Expression dieser Gene verstärken (Kewley et al., 2004). Gemäß der biologischen Rolle des Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressors als kompetitiver Inhibitor des AhR/Arnt-Signalweges via einer eigenen Heterodimerisierung mit Arnt und einer nachfolgenden Bindung an XRE, würde eine Induktion der Genexpression des Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressors durch eben dieses AhR/Arnt-Heterodimer eine negative Rückkopplungsschleife dieses Signaltransduktionsweges vermuten lassen (Mimura et al., 1998). Eine Induktion des humanen AhRR durch Aktivatoren dieser Signalkaskade wie TCDD oder BaP konnte auf mRNA-Niveau gezeigt werden (Tsuchiya et al., 2003). Ferner ließen sich bei der Maus funktionell aktive XRE in der 5'-stromaufwärts liegenden Region des AhRR-Gens finden (Mimura et al., 1998). Diese waren in ihrer funktionellen Aktivität an die ebenfalls gefundenen Sp1-Bindungsstellen gekoppelt (Baba et al., 2001). Um die funktionelle Aktivität der gefundenen XRE des humanen AhRR zu überprüfen, wurden Luciferase-Reportergen-Assays mit A549-Zellen und HepG2-Zellen unter Belastung mit BaP durchgeführt. Dabei zeigte sich eine Induzierbarkeit durch BaP in HepG2-Zellen, während sich die Luciferase-Aktivität in A549-Zellen nicht induzieren ließ. Dies lässt auf eine funktionelle Aktivität dieser XRE schließen, die allerdings gewebsspezifisch zu sein scheint, passend zu den Befunden der Literatur, die eine Induzierbarkeit des humanen AhRR auf mRNA-Niveau durch Liganden des AhR als gewebes- und zelllinienspezifisch beschreiben und auch hier eine Induzierbarkeit in HepG2-Zellen, aber keine in A549-Zellen zeigen (Tsuchiya et al., 2003). Auffallend ist, dass der AhRR vor allem in Zellen induzierbar ist, in denen andere Zielgene des AhR wie CYP1A1 ebenfalls induzierbar sind, während in Zellen, in denen der AhRR nicht induzierbar ist, CYP1A1 auch nicht induziert wird (Tsuchiya et al., 2003). Möglicherweise ist dies die Folge einer höheren Bindungsaffinität des AhR/Arnt-Dimers an XRE des CYP1A1-Gens im Vergleich zu den XRE des AhRR, was sich für den murinen AhRR bereits zeigen ließ (Baba et al., 2001). Die Vermutung einer negativen Rückkopplungsschleife (Mimura et al., 1998) läßt sich durch diese Befunde somit nicht stützen (Tsuchiya et al., 2003).

5.3. Interleukin 6-Responsive-Elemente und Responsivität auf Oncostatin M-Behandlung

Oncostatin M ist ein glykopeptidisches Interleukin 6-Typ-Zytokin, das über eine Bindung an einen IL6-Typ-Zytokin-Rezeptor-Komplex eine Signalkaskade in Richtung des Zellkerns initiiert (Chen und Benveniste, 2004). Durch Rekrutierung von Janus-Kinasen (JAK), das sind zytoplasmatische Tyrosin-Kinasen, werden zytoplasmatische Signaltransduktions- und Transaktivations-Moleküle (STATs) durch Phosphorylierung aktiviert und in den Kern transloziert, wo sie an der Regulation bestimmter Gene beteiligt sind (Tanaka und Miyajima, 2003). STATs entfalten ihre Wirkung durch spezifische Bindung an Erkennungssequenzen, sogenannte Interleukin 6-Responsive-Elemente, in Promoterregionen regulierter Gene (Liu und Fuller, 1995). Biologische Wirkungen entfaltet OSM in der Regulierung von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Akutphase-Reaktionen (Gomez-Lechon, 1999; Heinrich et al., 2003). In unserem Labor konnte eine Induzierbarkeit des humanen AhRR und AhR durch Oncostatin M auf mRNA-Niveau in HepG2-Zellen gezeigt werden (Wolff et al., nicht publiziert). Dabei führt ein rascher und steiler Anstieg der AhRR-Expression und ein etwas verzögerter und schwächerer Anstieg der AhR-Expression zu einer deutlichen Reduktion der CYP1A1-Expression, die vermutetermaßen durch die gesteigerte AhRR-Expression bedingt ist. Die gefundenen vier putativen IL 6-REs zeigten allerdings in OSM-Belastungsstudien mit in HepG2-Zellen transfizierten AhRR-Promoter-Luciferase-Vektoren nach 24h keine signifikante Erhöhung der Luciferase-Aktivität, was ich als Hinweis auf eine fehlende funktionelle Bedeutung wertete.

5.4. Repetitive Sequenzen und putative E-Boxen

Repetitive Elemente sind aufeinander folgende, sich wiederholende Abschnitte mit gleicher oder sehr ähnlicher Sequenz, die sich in großer Zahl in nicht-codierenden Regionen von Genomen finden lassen und viele regulative Elemente enthalten (Horng und Cho, 2000). Sie lassen sich unter anderem in der Promoterregion des Gens des Cytochrom P450 Subtyp 2E1 (CYP2E1) finden (Fritsche et al., 2000). Dies ist ein Enzym des Fremdstoffmetabolismus, das eine Vielzahl endogener und exogener Substanzen wie Alkohol metabolisieren kann und durch diese auch induzierbar ist (Fritsche et al., 2000; Lieber, 1997). Ferner ließen sich ein Polymorphismus bezüglich der Anzahl dieser repetitiven Elemente und dessen funktionelle Bedeutung für die Induzierbarkeit von CYP2E1 zeigen. Dabei führt eine Insertion von zwei zusätzlichen Repetitionen zu einer höheren Induzierbarkeit von CYP2E1 im Vergleich zum Wildtyp (McCarver et al., 1998). Dies unterstreicht die potentielle funktionelle Bedeutung von zusätzlichen repetitiven Elementen in Promoterregionen. Auch eine unterschiedliche

Distribution bezüglich dieser Insertion von zwei zusätzlichen repetitiven Elementen in verschiedenen ethnischen Gruppen ließ sich nachweisen. Die beschriebenen Repeats im CYP2E1-Promoter zeigten eine hohe Wildtyp-Allelfrequenz bei europäischen/kaukasischen Bevölkerungsgruppen, während die Frequenz der mutanten Allele vor allem bei asiatischen Bevölkerungsgruppen vorkommt (Fritsche et al., 2000). Dies bedeutet neben dem bekannten Polymorphismus der Aldehyd-Dehydrogenase 2 einen weiteren Polymorphismus des Alkoholmetabolismus mit vorwiegender Verbreitung in asiatischen Populationen (Fritsche et al., 2000; Couzigou et al., 1994). Im Promoter des humanen AhRR wurden acht aufeinander folgende repetitive Elemente im Sequenzbereich von -700 bis -408 gefunden. Dabei waren die einzelnen repetitiven Sequenzen 35 bis 37 bp lang und zeigten ein hohes Maß an Homologie zueinander. In der Sequenz des etwa 800 bp langen Promoterfragmentes fanden wir zudem ein neuntes repetitives Element von 37 bp. Dies bedeutet einen Polymorphismus in einer potentiell regulativen Genregion, deren funktionelle Relevanz noch zu klären ist. Die Vermutung der funktionellen Bedeutung wird unterstützt durch den Befund der vier putativen E-Box-Sequenzen innerhalb der acht repetitiven Sequenzen des 1.800 bp-Promoterfragments. In dem neunten repetitiven Element des 800 bp-Fragmentes befand sich eine weitere putative E-Box. E-Boxen sind DNA-Sequenzen in Promoterregionen regulierter Gene, die als Bindungsstellen für Arnt dienen (Antonsson et al., 1995). Dabei läßt die Beteiligung des Arnt an der Dimerbildung mit verschiedenen bHLH/PAS-Proteinen (Kewley et al., 2004) vielfältige Vermutungen bezüglich der funktionellen Bedeutung der gefundenen putativen E-Box-Elemente zu, die in weiteren Versuchen geprüft werden.

5.5. Transforming growth factor β und seine Wirkung auf den Arylhydrocarbon-Rezeptor-Signalweg

Der Transforming growth factor β war der erste identifizierte Wachstumsfaktor einer Gruppe von Zytokinen, die an Prozessen des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung beteiligt sind (Attisano und Wrana, 1996). Dabei initiieren sie durch eine Membranrezeptorbindung Signalprozesse, die zu einer veränderten Genexpression in der Zelle führen (Schiller et al., 2004). Eine dieser Wirkungen ist die Abnahme der basalen und TCDD-induzierten CYP1A1-Expression sowie der AhR-Expression in humanen A549-Zellen (Vogel et al., 1994; Döhr et al., 1997). Die Reduktion der Expression des CYP1A1 und des AhR läuft dabei simultan ab, was vermuten läßt, dass die Abnahme der CYP1A1-Expression unabhängig von der reduzierten AhR-Expression ist und über einen weiteren Faktor bewirkt wird (Döhr et al., 1997). Ich führte Transfektionsstudien mit dem klonierten Promoterkonstrukt des humanen AhRR in A549-Zellen zur Bestimmung der Aktivität nach TGF β -Behandlung im

Vergleich zur unbehandelten Kontrolle durch. Dabei zeigte sich eine signifikant höhere Aktivität in behandelten Zellen, was mich annehmen läßt, dass es sich bei dem in der Literatur bereits vermuteten Inhibitor der TGF β -vermittelten CYP 1A1-Expression um den AhRR handelt. In HepG2-Zellen fand sich keine TGF β -bedingte Induktion der Luciferase-Aktivität bei vergleichbaren Versuchen, was möglicherweise auf eine Gewebsspezifität der Reaktion zurückzuführen ist.

5.6. Vergleich des humanen und murinen AhRR-Promoters

Ein computergestützter Sequenzvergleich des humanen und des bereits publizierten murinen AhRR-Promoters (Baba et al., 2001) zeigte eine nur geringe Sequenzidentität von etwa 45%. Eine weitere Analyse zeigte aber eine weitreichende strukturelle Ähnlichkeit der beiden Promoter. So handelt es sich bei beiden um TATAA- und CAAT-Box-freie Promoter mit putativen Sp1-Bindungsstellen, wobei für den Maus-Promoter zwei beschrieben sind (Baba et al., 2001), während sich im humanen Promoter vier putative Sp1-Bindungsstellen finden lassen. Auch konnte ich drei putative XRE in der humanen Promotersequenz finden, die in Luciferase-Assays in HepG2-Zellen eine funktionelle Aktivität zeigten, während für den murinen Promoter ebenfalls drei XRE mit funktioneller Aktivität beschrieben sind (Baba et al., 2001). Bezüglich repetitiver Sequenzen, putativer E-Boxen und IL6-RE im murinen Promoter ist in der Literatur nichts bekannt. Die beobachteten strukturellen Gemeinsamkeiten lassen vermuten, dass es trotz der nur geringen Sequenzidentität eine weitgehende funktionelle Gleichartigkeit der Genregulation beim humanen und murinen AhRR gibt.

6. Zusammenfassung

Der Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressor (AhRR) ist ein neues Mitglied der basic-Helix-Loop-Helix-/Per-Arnt-Sim(bHLH-/PAS) -Familie von Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) und den Arylhydrocarbon-Rezeptor-Nukleären-Translokator (Arnt) umfasst. Der AhRR wirkt als Regulator der AhR-Signalkaskade. Über die Funktion des AhRR ist wenig bekannt. Aus *in-vitro*-Daten geht hervor, dass der AhRR die Transkription AhR-regulierter Gene supprimiert. Allerdings gibt es keine Hinweise in der Literatur, dass dies auch *in-vivo* der Fall ist.

Ziel meiner Arbeit war deswegen, da weder die Regulation noch die Funktion des AhRR bekannt ist, regulative Sequenzen in der 5'-aufwärts-Region des humanen AhRR zu identifizieren.

Mittels PCR-Klonierungsstrategie gelang es, aus humaner genomischer DNA zwei Promoterkonstrukte einer Größe von 800 bp und 1.8 kbp zu isolieren. Diese wurden in pGL3-basic-Vektoren für nachfolgende Luciferase-Reporter-Gen-Assays kloniert.

Die Suche nach putativen Bindungselementen ergab vier putative Sp1-Bindungsstellen und drei putative Xenobiotika-Responsive-Elemente (XRE). Durchgeführte Reporter-Gen-Assays mit HepG2-Zellen unter Belastung mit Benzo(a)pyren zeigten eine vierfache Induktion der Aktivität, während sich in A549-Zellen keine signifikante Zunahme der Aktivität darstellen ließ.

Die Sequenzanalyse ergab acht repetitive Elemente einer Größe von 35 bis 37 bp, die vier putative E-Boxen enthielten. E-Boxen sind putative Bindungsstellen für Arnt. Die Klone sind hinsichtlich der repetitiven Sequenzen polymorph, da das 800 bp große Promoterkonstrukt ein zusätzliches repetitives Element mit einer zusätzlichen putativen E-Box enthält.

Durch zusätzliche Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung ließ sich nachweisen, dass unter Einfluß von TGF β in A549-Zellen die Luciferase-Aktivität erhöht wird. Dies war für HepG2-Zellen nicht der Fall.

Die Daten meiner Arbeit zeigen, dass der AhRR ein XRE-reguliertes Gen ist, das möglicherweise polymorph vorliegt. Die Bedeutung der identifizierten polymorphen Sequenzen ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

7. Literatur

Antonsson C, Arulampalam V, Whitelaw ML, Pettersson S, Poellinger L. Constitutive function of the basic helix-loop-helix/PAS factor Arnt. Regulation of target promoters via the E box motif. *J Biol Chem.* 1995 Jun 9;270(23):13968-72.

Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by members of the transforming growth factor-beta superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996 Dec;7(4):327-39.

Baba T, Mimura J, Gradin K, Kuroiwa A, Watanabe T, Matsuda Y, Inazawa J, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J Biol Chem.* 2001 Aug 31;276(35):33101-10.

Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and Krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol.* 2001 Aug;188(2):143-60.

Black AR, Jensen D, Lin SY, Azizkhan JC. Growth/cell cycle regulation of Sp1 phosphorylation. *J Biol Chem.* 1999 Jan 15;274(3):1207-15.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:241-50.

Chen SH, Benveniste EN. Oncostatin M: a pleiotropic cytokine in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Oct;15(5):379-91

Cook T, Gebelein B, Urrutia R. Sp1 and its likes: biochemical and functional predictions for a growing family of zinc finger transcription factors. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Jun 30;880:94-102.

Couzigou P, Coutelle C, Fleury B, Iron A. Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes, alcoholism and alcohol related disease. *Alcohol Alcohol Suppl.* 1994;2:21-7.

Dohr O, Sinning R, Vogel C, Munzel P, Abel J. Effect of transforming growth factor-beta1 on expression of aryl hydrocarbon receptor and genes of Ah gene battery: clues for independent down-regulation in A549 cells. *Mol Pharmacol.* 1997 May;51(5):703-10.

Dohr O, Abel J. Transforming growth factor-beta1 coregulates mRNA expression of aryl hydrocarbon receptor and cell-cycle-regulating genes in human cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Dec 8;241(1):86-91.

Fradette C, Du Souich P. Effect of hypoxia on cytochrome P450 activity and expression. *Curr Drug Metab.* 2004 Jun;5(3):257-71.

Fritsche E, Pittman GS, Bell DA. Localization, sequence analysis, and ethnic distribution of a 96-bp insertion in the promoter of the human CYP2E1 gene. *Mutat Res.* 2000 Feb;432(1-2):1-5.

Gharavi N, El-Kadi AO. Down-regulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide in murine hepatoma hepa 1c1c7 cells. *J Pharm Sci.* 2004 Dec 30;94(3):493-506.

- Gomez-Lechon MJ.** Oncostatin M: signal transduction and biological activity. *Life Sci.* 1999;65(20):2019-30.
- Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P.** The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Dispos.* 1998 Dec;26(12):1194-8.
- Gradin K, Toftgard R, Poellinger L, Berghard A.** Repression of dioxin signal transduction in fibroblasts. Identification Of a putative repressor associated with Arnt. *J Biol Chem.* 1999 May 7;274(19):13511-8.
- Gronostajski RM.** Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene.* 2000 May 16;249(1-2):31-45.
- Guillen MI, Donato MT, Jover R, Castell JV, Fabra R, Trullenque R, Gomez-Lechon MJ.** Oncostatin M down-regulates basal and induced cytochromes P450 in human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998 Apr;285(1):127-34.
- Hankinson O.** Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys.* 2005 Jan 15;433(2):379-86
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F.** Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003 Aug 15;374(Pt 1):1-20.
- Horng JT, Cho WF.** Predicting regulatory elements in repetitive sequences using transcription factor binding sites. *Electronic Journal of Biotechnology* 2000 Dec; 3(3).
- Javahery R, Khachi A, Lo K, Zenzie-Gregory B, Smale ST.** DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 1994 Jan;14(1):116-27.
- Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A.** The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Feb;36(2):189-204.
- Lahvis GP, Lindell SL, Thomas RS, McCuskey RS, Murphy C, Glover E, Bentz M, Southard J, Bradfield CA.** Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Sep 12;97(19):10442-7.
- Lieber CS.** Cytochrome P-450E1: its physiological and pathological role. *Physiol Rev.* 1997 Apr;77(2):517-44.
- Liu Z, Fuller GM.** Detection of a novel transcription factor for the A alpha fibrinogen gene in response to interleukin-6. *J Biol Chem.* 1995 Mar 31;270(13):7580-6.
- Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC.** Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature.* 1997 Mar 27;386(6623):403-7.
- McCarver DG, Byun R, Hines RN, Hichme M, Wegenek W.** A genetic polymorphism in the regulatory sequences of human CYP2E1: association with increased chlorzoxazone hydroxylation in the presence of obesity and ethanol intake. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998 Sep;152(1):276-81.

- Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y.** Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* 1999 Jan 1;13(1):20-5.
- Mimura J, Fujii-Kuriyama Y.** Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Feb 17;1619(3):263-8.
- Philipsen S, Suske G.** A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 1999 Aug 1;27(15):2991-3000.
- Puga A, Marlowe J, Barnes S, Chang CY, Maier A, Tan Z, Kerzee JK, Chang X, Strobeck M, Knudsen ES.** Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Toxicology.* 2002 Dec 27;181-182:171-7.
- Puga A, Tomlinson CR, Xia Y.** Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways. *Biochem Pharmacol.* 2005 Jan 15;69(2):199-207.
- Swanson HI.** DNA binding and protein interactions of the AHR/ARNT heterodimer that facilitate gene activation. *Chem Biol Interact.* 2002 Sep 20;141(1-2):63-76.
- Swanson HI, Yang J.** Specificity of DNA binding of the c-Myc/Max and ARNT/ARNT dimers at the CACGTG recognition site *Nucleic Acids Res.* 1999 Aug 1;27(15):3205-3212.
- Tanaka M, Miyajima A.** Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003;149:39-52.
- Torigoe T, Izumi H, Yoshida Y, Ishiguchi H, Okamoto T, Itoh H, Kohno K.** Low pH enhances Sp1 DNA binding activity and interaction with TBP. *Nucleic Acids Res.* 2003 Aug 1;31(15):4523-30.
- Tsuchiya Y, Nakajima M, Itoh S, Iwanari M, Yokoi T.** Expression of aryl hydrocarbon receptor repressor in normal human tissues and inducibility by polycyclic aromatic hydrocarbons in human tumor-derived cell lines. *Toxicol Sci.* 2003 Apr;72(2):253-9. Epub 2003 Mar 07
- Vogel C, Dohr O, Abel J.** Transforming growth factor-beta 1 inhibits TCDD-induced cytochrome P450IA1 expression in human lung cancer A549 cells. *Arch Toxicol.* 1994;68(5):303-7.
- Vrzal R, Ulrichova J, Dvorak Z.** Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. *Biomed Pap* 2004 Jul;148(1):3-10.
- Wolff S, Harper PA, Wong JM, Mostert V, Wang Y, Abel J.** Cell-specific regulation of human aryl hydrocarbon receptor expression by transforming growth factor-beta(1). *Mol Pharmacol.* 2001 Apr;59(4):716-24.
- Zaher H, Fernandez-Salguero PM, Letterio J, Sheikh MS, Fornace AJ Jr, Roberts AB, Gonzalez FJ.** The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor-beta and apoptosis. *Mol Pharmacol.* 1998 Aug;54(2):313-

8. Abkürzungen

AhR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
AhRR	Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressor
AIP	Hepatitis-B-Virus-X-assoziiertes Protein
Arnt	Arylhydrocarbon-Rezeptor-Nukleärer-Translokator
BaP	Benzo(a)pyren
bHLH	basic-Helix-Loop-Helix
BMS	Basal Medium Supplement
CYP1A1	Cytochrom P450 Isoform 1A1
CYP1A2	Cytochrom P450 Isoform 1A2
CYP2E1	Cytochrom P450 Isoform 2E1
Dest.	Destilliert
DMEM	DULBECCO 's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
dNTP	Nukleotide
FCS	Fetales Kälberserum
FW-Primer	Vorwärts-Primer
H ₂ O	Wasser
HSP90	Hitze-Schock-Protein 90
IL6	Interleukin 6
IL6-RE	Interleukin 6-Responsives-Element
JAK	Janus-Kinasen
KCl	Kaliumchlorid
LB	Luria-Bertani
Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
MgCl ₂	Magnesiumdichlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mRNA	messenger-RNA
β-MSH	β-Mercaptoethanol
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ EDTA	Di-Natrium-Ethylendiamin-Tetraacetat
NaHCO ₃	Natriumbicarbonat
NaOH	Natriumhydroxid

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NLS	Nukleäre-Lokalisierungs-Sequenz
OSM	Oncostatin M
PAH	Polyzyklisches aromatisches Kohlenwasserstoff
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PAS	Per/Arnt/Sim
RW-Primer	Rückwärts-Primer
STAT	Signaltransduktions- und Transaktivations-Molekül
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TESS	Transcription Element Search System
TGF β	Transforming growth factor β
THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultraviolett
XAP2	Hepatitis-B-Virus-X-assoziiertes Protein
XRE	Xenobiotika-Responsives-Element

Curriculum vitae

Vor- und Zuname Amitabh Kohli
Adresse Korallenweg 2
 41564 Kaarst
Geburtsdatum 13. April 1975
Geburtsort Bad Oeynhausen
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung:

08/1981 bis 07/1985 Gemeinschaftgrundschule Holzbüttgen, Kaarst
08/1985 bis 05/1994 Marie-Curie-Gymnasium, Neuss
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

10/1994 bis 10/1995 Medizinische Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf, Pflegedienst in der Chirurgie

Studium:

10/1995 bis 06/2002 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
09/1997 Ärztliche Vorprüfung
04/1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2001 bis 06/2002 Praktisches Jahr, Klinikum Krefeld
06/2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
07/2002 Erlaubnis für die Tätigkeit als Arzt im Praktikum

Beruflicher Werdegang:

08/2002 bis 07/2003 Doktorand im Medizinischen Institut für Umwelthygiene (jetzt:
Institut für Umweltmedizinische Forschung gGmbH an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)
08/2003 bis 06/2004 Arzt im Praktikum in der Klinik für Hämatologie, medizinische
Onkologie und Immunologie des St. Johannes-Hospitals,
Duisburg
07/2004 bis 12/2004 Arzt im Praktikum, seit 10/2004 Assistenzarzt der Medizinischen
Klinik, Krankenhaus Maria-Hilf, Krefeld
06/2005 bis 01/2006 Assistenzarzt der Medizinischen Klinik IV, Universitätsklinikum
Aachen

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel "Untersuchungen zur Regulation des humanen Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressors" selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich habe die vorliegende Dissertation weder in der vorliegenden noch in einer ähnlichen Form bei einer anderen Institution eingereicht.

Amitabh Kohli

Düsseldorf, Januar 2006