

**Expression, transkriptionelle Regulation und
biologische Funktion des humanen
Arylhydrokarbon Rezeptor Repressors**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Thomas Haarmann-Stemann

aus Krefeld

Düsseldorf

Mai 2007

Angefertigt am Institut für umweltmedizinische Forschung gGmbH
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Josef Abel

Koreferent: Prof. Dr. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2007

INHALTSVERZEICHNIS.....	1
1 Einleitung.....	4
1.1 Die Proteine der bHLH-PAS Familie.....	6
1.2 Der Arylhydrokarbon Rezeptor (AhR).....	8
1.3 Der AhR Repressor (AhRR).....	14
1.4 Der AhR Nuklear Translokator (ARNT).....	16
1.5 Das Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1).....	17
1.6 Der Hypoxie-Induzierbare Faktor (HIF-1 α).....	17
1.7 Epigenetische Mechanismen der Genregulation.....	18
1.8 Zielsetzung.....	20
2 Material & Methoden.....	21
2.1 Zellkultur.....	21
2.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien.....	21
2.1.2 Belastung der Zellen.....	22
2.2 Isolation, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	23
2.2.1 Isolation von Gesamt-RNA.....	23
2.2.2 Isolation von Plasmid-DNA.....	23
2.2.3 Isolation von genomischer DNA.....	23
2.2.4 Aufreinigungen von DNA.....	23
2.2.5 Gelelektrophorese von DNA.....	24
2.2.6 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA.....	24
2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) -Techniken.....	24
2.3.1 cDNA-Synthese.....	24
2.3.2 Standard PCR.....	25
2.3.3 Quantitative <i>Real-Time</i> PCR (qRT-PCR).....	26
2.4 Restriktionsverdau von DNA.....	28
2.5 Generierung der Reporterplasmide <i>pAhRR</i> und <i>pAhRR-Δ1 bis -Δ5</i>	29
2.6 Allgemeine Techniken zur Klonierung.....	30
2.6.1 Dephosphorylierung von DNA.....	30

2.6.2	Ligation	31
2.6.3	Transformation	31
2.7	Transfektion eukaryotischer Zellen	32
2.7.1	Transfektion von Plasmid-DNA	32
2.7.2	RNA Interferenz	33
2.8	Reporter-Gen Analysen	34
2.9	Bisulfit-Modifikation von DNA	35
2.10	Chromatin Immunpräzipitation (ChIP).....	36
2.11	Co-Immunpräzipitation von HDAC-1 und AhRR	39
2.11.1	Gewinnung von Kernproteinen.....	39
2.11.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	40
2.11.3	Immunpräzipitation.....	40
2.11.4	Western Blot Analyse	40
2.12	Computer-Programme zur Sequenz- und Datenanalyse	42
2.13	Statistik	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Expression von AhRR und CYP1A1 in den verwendeten humanen Zelllinien	43
3.2	Struktur des humanen AhRR Gens	45
3.3	Identifizierung responsiver XRE-Motive des humanen AhRR Gens	47
3.4	Regulation des humanen AhRR Gens durch AhR, ARNT und AhRR	50
3.5	Regulation des humanen AhRR Gens durch GC Box-bindende Transkriptionsfaktoren	52
3.6	Einfluss von Hypoxie-simulierenden Agenzien auf die AhRR Transkription in HepG2 Zellen	57
3.7	Untersuchungen zum Mechanismus der negativen AhRR Rückkopplung	62
3.8	Analyse der molekularen Wirkmechanismen des AhRR.....	65
3.9	Besonderheiten der AhRR Regulation in A549 Zellen.....	68
4	Diskussion	73
4.1	Charakterisierung der verwendeten Zelllinien: Expression von AhRR und CYP1A1.....	74
4.2	Regulation der humanen AhRR Genexpression	76
4.3	Untersuchungen zur molekularen Funktion des humanen AhRR	83
4.4	Regulation von CYP1A1 und AhRR in der Lungenkarzinomzelllinie A549	85

4.5 Einordnung dieser Arbeit.....	87
5 Zusammenfassung.....	89
6 Literaturverzeichnis.....	90
7 Abkürzungsverzeichnis	109
Anmerkungen.....	112

1 Einleitung

Mensch und Tier sind täglich einer Vielzahl von chemischen Substanzen ausgesetzt, mit denen sie über Nahrung, Wasser und Luft in Kontakt geraten. Einige dieser Stoffe wirken relativ unspezifisch auf die exponierten Gewebe bzw. Zellen ein und schädigen biologische Strukturen und Makromoleküle. Andere Substanzen wiederum sind in der Lage, an intrazelluläre Rezeptormoleküle zu binden und dadurch die Signaltransduktion einer Zelle zu beeinflussen. Diese Stoffe lösen somit ein charakteristisches Spektrum von biochemischen und toxischen Wirkungen in einem Organismus aus. Gut untersuchte fremdstoffbindende Rezeptoren sind z.B. der Pregnan X Rezeptor (PXR), der konstitutive Androstan Rezeptor (CAR) oder der in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehende Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) (Nakata et al., 2006).

Zu der Gruppe der AhR-bindenden Chemikalien (Liganden) gehören u.a. die in der Umwelt ubiquitär verbreiteten, persistenten halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe und die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe. Diese Stoffe entstehen bei Verbrennungsprozessen und gelangen somit permanent in unsere Umwelt. Unter diesen lipophilen Chemikalien finden sich einige Vertreter mit hohem toxischem Potential wieder. Der wohl prominenteste Vertreter dieser Gruppe von Umweltchemikalien ist das 1976 bei einem tragischen Chemieunfall als „Seveso-Gift“ bekannt gewordene 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Das Spektrum der durch diese Substanz hervorgerufenen toxischen Effekte ist breit gefächert und umfasst beispielsweise Prozesse wie Immunsuppression, Teratogenese und Kanzerogenese (Bock & Köhle, 2006). Des Weiteren kommt es durch die Exposition mit TCDD und verwandten Chemikalien zu einer adaptiven Induktion des fremdstoffmetabolisierenden Enzymsystems. Sowohl Toxizität als auch Enzyminduktion werden von dem zytoplasmatisch lokalisierten Transkriptionsfaktor AhR vermittelt. Durch Bindung eines Liganden wird das AhR-Molekül aktiviert und dringt in den Zellkern ein, wo es ein Heterodimer mit seinem Partnermolekül ARNT (AhR Nuklear Translokator) bildet. Der AhR/ARNT-Komplex ist in der Lage durch Bindung an spezifische DNA-Motive die Expression von Genen zu modulieren. Die auf diese Weise regulierten Gene bzw. deren Genprodukte üben verschiedene Funktionen innerhalb des Fremdstoffwechsels aus, können aber auch Prozesse des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung beeinflussen.

Vor einigen Jahren konnte ein weiteres Mitglied der AhR-Signalkaskade identifiziert werden, der AhR Repressor (AhRR). Die Expression des AhRR wird durch den ligandenaktivierten AhR kontrolliert. Mit Hilfe von Überexpressionsstudien konnte gezeigt werden, dass der AhRR in der Lage ist den Ablauf AhR-abhängiger Signalwege zu supprimieren (Mimura et al., 1999). Über die molekulare Funktionsweise und die Bedeutung des AhRR für die AhR-vermittelten biologischen und toxischen Prozesse ist bis heute wenig bekannt.

1.1 Die Proteine der bHLH-PAS Familie

Die an der Regulation der AhR-Signalkaskade beteiligten Transkriptionsfaktoren gehören zu der Superfamilie der bHLH-PAS Proteine. Die Mitglieder der bHLH-PAS Familie stellen essentielle Sensormoleküle dar, die es der Zelle bzw. dem Organismus ermöglichen auf entwicklungsbiologische und umweltbedingte Reize zu reagieren (Crews, 1998; Crews & Fan, 1999; Gu et al., 2000). Wie in Tabelle 1 aufgezeigt, sind bHLH-PAS Proteine u.a. in der Regulation der zirkadianen Uhr (Clock, Bmal1), des Fremdstoffwechsels (AhR, ARNT, AhRR), der Neurogenese (Sim, Nxf) und der sauerstoffabhängigen Signalübertragung (HIFs, ARNT, IPAS) involviert (Gu et al., 2000; Kewley et al., 2004).

Tab. 1 Mitglieder der bHLH-PAS Familie und ihre Hauptfunktionen.

Die Moleküle der Klasse 1 sind farbig, die Proteine der Klasse 2 weiß unterlegt.

bHLH-PAS Protein	Funktion	bHLH-PAS Protein	Funktion
Sim 1 Sim 2 Nxf NPAS 1 ARNT 2	Neurogenese	AhR AhRR ARNT / HIF-1 β	Fremdstoffmetabolismus Leberentwicklung
Clock NPAS 2 Per 1 * Per 2 * Per 3 * BMAL 1	Zirkadianer Rhythmus	HIF-1 α HIF-2 α / EPAS 1 HIF-3 α ** IPAS ** ARNT / HIF-1 β	Hypoxie Embryogenese Wundheilung

* = keine bHLH Domäne

** = Splice-Varianten eines Gens

Diese Proteine zeichnen sich durch hohe Strukturhomologien aus (Abb. 1). Die Namensgebung erfolgte auf Grund von zwei charakteristischen Strukturmotiven, der bHLH- und der PAS-Domäne. Die *basic Helix-Loop-Helix*-Domäne ist im N-terminalen Bereich dieser Moleküle lokalisiert und dient der DNA-Bindung und Dimerisierung (Murre et al., 1994; Gu et al., 2000). Innerhalb dieser Domäne sind häufig nukleare Im- und Exportsignale (NLS, NES) zu finden, welche die Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle determinieren (Moroianu, 1999). Die zweite typische Domäne dieser Proteine ist die PAS-Domäne. Diese Bezeichnung beruht auf der Entdeckung dieses Motivs in zwei Proteinen von *Drosophila melanogaster*: dem an der Steuerung des zirkadianen Rhythmus beteiligtem *period* (Per) und

dem in der Neurogenese involvierten *single-minded* Protein (Sim) (Citri et al., 1987; Nambu et al., 1991). Die Identifizierung des verwandten Säugetier Proteins ARNT führte zu der Bezeichnung Per-ARNT-Sim-Domäne (Hoffman et al., 1991). Die PAS-Domäne besteht aus 250 bis 300 Aminosäuren (AS) und enthält zwei ca. 50 AS lange degenerierte Subdomänen, PAS-A und PAS-B. Die PAS-Domäne dient der Interaktion mit Chaperon-Molekülen (hsp90 u.a.) und der Dimerbildung von bHLH-PAS Proteinen untereinander (Gu et al., 2000). Im Gegensatz zu den stark konservierten bHLH- und PAS-Domänen zeigen die C-terminalen Bereiche der bHLH-PAS Proteine deutlich geringere Strukturhomologien auf. Die meisten bHLH-PAS Proteine besitzen, im Einklang mit ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren, eine glutaminreiche Transaktivierungsdomäne (TAD) im C-Terminus (Gu et al., 2000).

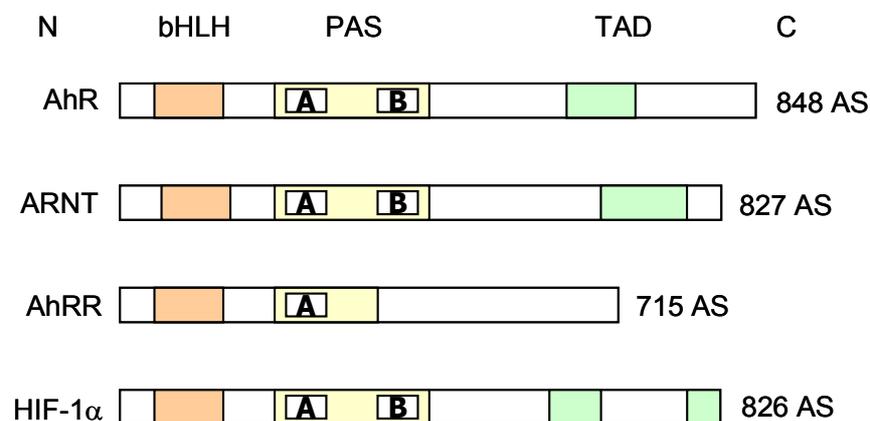


Abb. 1 Charakteristischer Aufbau von bHLH-PAS Proteinen.

Die in Aminosäuren (AS) angegebene Größe der gezeigten Proteine bezieht sich auf die humanen Moleküle.

Die Aktivierung von bHLH-PAS Molekülen durch exo- oder endogene Reize hat die Bildung von Homo- und Heterodimeren zur Folge, die in der Lage sind die Expression von Genen zu modulieren. Die bHLH-PAS Proteine werden in zwei Klassen unterteilt (Kewley et al., 2004): die funktionsbestimmenden Proteine der Klasse 1 sowie die stabil exprimierten Mitglieder der Klasse 2 (Tab. 1). Während Moleküle der Klasse 1 nur Heterodimere mit Vertretern der Klasse 2 bilden, können Klasse 2 Proteine auch Homodimere bilden (Lindebro et al., 1995; Swanson & Yang, 1999). Die Dimerbildung dieser Proteine erfolgt durch Interaktionen der HLH-Regionen sowie der PAS-Domänen (Fukunaga et al., 1995).

Die Bedeutung funktionstüchtiger bHLH-PAS Proteine für den Organismus wurde durch Untersuchungen an defizienten Mäusen ersichtlich. Beispielsweise sind HIF-1 α - oder ARNT-defiziente Tiere ab Tag 10 bis 11 der Trächtigkeit nicht lebensfähig. Die Embryonen zeigen massive entwicklungsbiologische Defekte in diversen Strukturen auf, die primär auf eine unzureichende Vaskularisierung zurückzuführen sind (Maltepe et al., 1997; Iyer et al., 1998; Ryan et al., 1998). Sim-1 oder ARNT-2 defiziente Tiere sterben unmittelbar nach der Geburt auf Grund fehlender neuronaler Strukturen, wie den sekretorischen Neuronen (Michaud et al., 1998; Hosoya et al., 2001). AhR-defiziente Tiere sind lebensfähig, weisen jedoch als typisches Merkmal eine deutliche Verminderung des Lebergewichts auf (Gonzalez & Fernandez-Salguero, 1998). Dieses ist durch einen persistierenden *ductus venosus* (ein während der Embryogenese essentieller, die Pfortader umgehender Kurzschluss des Blutflusses) zu erklären, wodurch es zu einer verminderten Vaskularisierung der Leber kommt (Schmidt et al., 1996; Lahvis et al., 2005).

1.2 Der Arylhydrokarbon Rezeptor (AhR)

Der Arylhydrokarbon Rezeptor (AhR) ist ein Ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor, der die biologischen und toxischen Effekte diverser Umweltchemikalien vermittelt. Klassische Liganden des AhR sind polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) und halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (HAKs). Die durch diese Chemikalien verursachte Aktivierung des AhR-Signalwegs führt zu der verstärkten Expression von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen, die der Elimination des Fremdstoffes dienen soll. Neben der Induktion dieser Enzyme vermittelt der AhR auch ein breites Spektrum biochemischer und toxischer Wirkungen dieser Xenobiotika. Außer dem AhR selbst sind zwei weitere strukturverwandte Proteine an dieser zellulären Signalkaskade beteiligt: der AhR Nuklear Translokator (ARNT) und der erst kürzlich identifizierte AhR Repressor (AhRR).

Die Entdeckung des AhR geht in die Mitte des letzten Jahrhunderts zurück. Es wurde beschrieben, dass die Exposition von Nagetieren gegenüber PAKs zu einer Induktion hepatischer mikrosomaler Enzyme, so genannter Arylhydrokarbon Hydroxylasen, führt (Conney et al., 1956). Dieser Beobachtung entsprang die Hypothese eines intrazellulären PAK-sensitiven Rezeptor-Moleküls, die schließlich durch den Einsatz von radioaktiv markiertem TCDD bestätigt werden konnte (Poland et al., 1976). Die Klonierung der AhR

cDNA und die damit verbundene Aufklärung der molekularen Gen- und Proteinstruktur erfolgte Anfang der 90er Jahre (Ema et al., 1992; Dolwick et al., 1993; Schmidt et al., 1993; Ema et al., 1994). Etwa zeitgleich wurde das ARNT Protein als Bindungspartner des AhR identifiziert, wodurch es zu der nachfolgenden mechanistischen Aufklärung der AhR Signalkaskade kam (Reyes et al., 1992; Matsushita et al., 1993; Reisz-Porszasz et al., 1994).

Der AhR ist das einzige Mitglied der bHLH-PAS Familie, das über eine Ligandenbindungsstelle verfügt. Diese ist in der PAS-B Region lokalisiert. Zu den Liganden des AhR gehören sowohl exogene, synthetische und natürliche, als auch endogen-gebildete Substanzen. Zu den exogenen synthetischen Liganden zählen eine Vielzahl ubiquitär verbreiteter lipophiler Umweltchemikalien wie die HAKs, zu denen die Dibenzo-*p*-dioxine, die Dibenzofurane und die polychlorierten Biphenyle gehören. Des Weiteren gehören auch PAKs wie Benzo(*a*)pyrene (B(*a*)P) oder 3-Methylcholanthren (3-MC) zu den synthetischen Liganden. Auch einige als Pharmazeutika eingesetzte Verbindungen wie der Magensäure-Blocker Omeprazol (Quattrochi & Tukey, 1993) oder das entzündungshemmende Schmerzmittel Sulindac (Ciolino et al., 2006) zählen zu der Gruppe synthetischer AhR-Liganden.

Neben den synthetischen Liganden gibt es natürlich vorkommende Substanzen, die in der Lage sind mit dem AhR zu interagieren. Hierzu gehören hauptsächlich pflanzliche Nahrungsinhaltsstoffe wie Flavonoide, Karotinoide und Phenolverbindungen (Denison & Nagy, 2003). Als Beispiele seien hier Indolo-3-Carbinol (Bjeldanes et al., 1991), Resveratrol (Ciolino et al., 1998a), Curcumin (Ciolino et al., 1998b) oder Quercetin (Ciolino et al., 1999) genannt.

Die Gruppe der endogenen Liganden des AhR besteht hauptsächlich aus Tryptophan-Derivaten (Rannug et al., 1987; Heath-Pagliuso et al., 1998; Rannug & Fritsche, 2006). Erst kürzlich konnte die UVB-abhängige intrazelluläre Bildung des hoch affinen AhR-Liganden 6-Formylindolo[3,2-*b*]Carbazol gezeigt werden (Fritsche et al., 2007). Weiterhin wurden der Carbonsäuremethylester ITE (Song et al., 2002) sowie Abbauprodukte des Hämoglobins (Phelan et al., 1998) als endogene AhR-Liganden beschrieben. Auch einige Prostaglandine (Seidel et al., 2001) und Steroidhormone (Jinno et al., 2006) können an den AhR binden.

Die durch den AhR vermittelte Toxizität wurde besonders intensiv am Beispiel des 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxins (TCDD) untersucht. Das Spektrum der durch TCDD hervorgerufenen biologischen und toxischen Effekte umfasst u.a. Immunsuppression, Hepatotoxizität, Chlorakne, Teratogenese, endokrine Disruption und Gewichtsverlust (*wasting syndrome*) (Gonzalez & Fernandez-Salguero, 1998; Safe et al., 1998; Kerkvliet, 2002; Marlowe & Puga, 2005; Bock & Köhle, 2006). TCDD wurde des Weiteren mit Prozessen der Tumorigenese und -promotion in Verbindung gebracht (Schwarz et al., 2000; Safe, 2001; Schwarz & Appel, 2005). Studien mit transgenen Mäusen, die den AhR konstitutiv überexprimieren, zeigen ein erhöhtes Auftreten spontaner sowie induzierter Tumoren und unterstreichen somit die Bedeutung des AhR für die Kanzerogenese (Andersson et al., 2002; Moennikes et al., 2004). Interessanterweise konnte ein konstitutiv aktivierter AhR in Brusttumoren identifiziert werden, der für die reprimierte Expression des für Tumorentstehung und -promotion kritischen (Proto-Onko-) Gens *c-myc* verantwortlich ist (Kim et al., 2000; Yang et al., 2005).

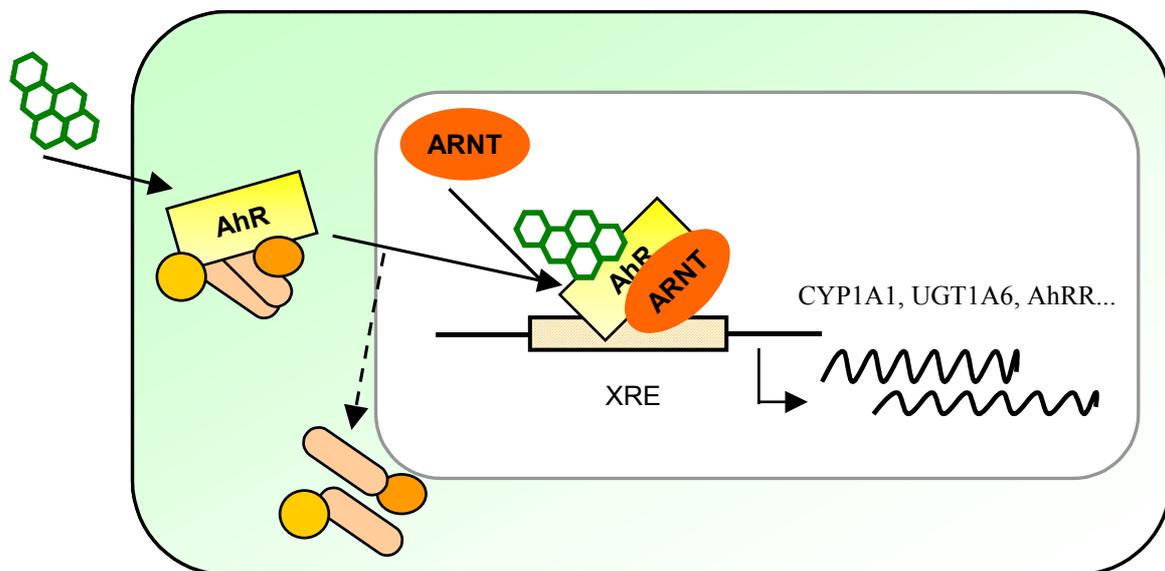


Abb. 2 Schematischer Ablauf der AhR-Signalkaskade.

Durch Bindung eines Liganden zerfällt der zytoplasmatische AhR-Komplex, und der AhR wandert in den Zellkern ein. Im Kern dimerisiert der AhR mit ARNT und bindet an XRE-Motive in den Promotor- oder Enhancer-Regionen von Genen. Dadurch kommt es zu einer induzierten Expression von Zielgenen wie beispielsweise CYP1A1, UGT1A6 und AhRR.

Die dem AhR-Signalweg zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind heute gut charakterisiert. Die induzierbare Expression des Cytochrom P450 Isoenzym 1A1 (CYP1A1) stellt das wohl am Besten charakterisierte Model zur Untersuchung der AhR-Signaltransduktion dar (Whitlock, Jr., 1999; Ma, 2001). Mechanistisch betrachtet ähnelt der Ablauf des AhR-Signalwegs dem der Steroidhormon-Rezeptoren (Xu et al., 2005; Nakata et al., 2006). Der im Folgenden beschriebene Mechanismus der AhR-Signaltransduktion ist in Abbildung 2 schematisch aufgezeigt:

In Abwesenheit eines Liganden liegt der AhR in Form eines Multiproteinkomplexes im Zytosol der Zelle vor. Neben dem AhR besteht dieser Komplex aus zwei Molekülen des Hitzeschockproteins 90 (hsp90) (Denis et al., 1988), dem Co-Chaperon p23 (Kazlauskas et al., 1999) sowie dem Immunophilin-ähnlichem *AhR interacting protein* (AIP), auch als *AhR associated protein* (ARA9) oder *Hepatitis Virus X associated protein 2* (XAP2) bekannt (Carver & Bradfield, 1997). Des Weiteren wird die Assoziation der Tyrosinkinase c-src mit diesem Proteinkomplex diskutiert (Enan & Matsumura, 1996).

Die Hauptaufgabe der AhR-gebundenen Komponenten besteht darin, den inaktiven AhR in einer Proteinkonformation zu stabilisieren, in der eine hohe Bereitschaft zur Ligandenbindung gewährleistet ist. Unter diesem Gesichtspunkt erfüllen die hsp90 Moleküle eine wichtige Funktion. Durch die Maskierung der DNA-bindenden bHLH-Domäne und der darin enthaltenen Kernlokalisations-Sequenz (NLS) sowie die Bindung an die Dimerisierungsdomäne wird die Translokation des AhR in den Zellkern und die nachfolgende Aktivierung der Genexpression in Abwesenheit eines Liganden verhindert (Pongratz et al., 1992; Whitelaw et al., 1993; Whitelaw et al., 1995; Perdew & Bradfield, 1996; Kazlauskas et al., 2001). Das AIP Molekül interagiert mit dem AhR Protein und dem hsp90-Dimer und trägt somit zur Stabilisierung des zytosolischen Multiproteinkomplexes bei (Bell & Poland, 2000; LaPres et al., 2000; Lees et al., 2003). Außerdem wurde beschrieben, dass das AIP Molekül den AhR vor Ubiquitinierung und nachgeschaltetem proteasomalen Abbau schützt (Kazlauskas et al., 2000). Das Co-Chaperone p23 trägt ebenfalls zur Stabilisierung des ligandenresponsiven Zustands des AhR bei (Kazlauskas et al., 1999; Cox & Miller, 2004). Die Tyrosinkinase c-src ist über die hsp90 Proteine mit dem zytosolischen AhR-Komplex assoziiert (Köhle et al., 1999).

Durch die Bindung eines Liganden erfährt das AhR Protein eine Konformationsänderung, die zur Freilegung der Kernlokalisations-Sequenz und nachfolgender Translokation des AhR in den Zellkern führt (Pollenz et al., 1994; Kazlauskas et al., 2001). Im Laufe des Translokationsprozesses zerfällt der Multiproteinkomplex, wobei die Tyrosinkinase c-src im Zytosol der Zelle verbleibt und in der Lage ist, membranständige Rezeptoren wie den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) zu phosphorylieren, wodurch es zu einer Aktivierung nachgeschalteter Signalwege kommt (Köhle et al., 1999; Fritsche et al., 2007; Park et al., 2007). Im Zellkern angelangt, bindet der AhR sein Partnermolekül ARNT, welches entgegen seiner Nomenklatur nuklear lokalisiert ist (Reyes et al., 1992; Probst et al., 1993; Hord & Perdew, 1994). Das AhR/ARNT-Dimer ist in der Lage, spezifische xenobiotisch-responsive Elemente (XRE) in der Promotor- oder Enhancer-Region von Genen zu erkennen und mit hoher Affinität an diese zu binden (Whitlock, Jr., 1999; Ma, 2001). Die Kernsequenz dieser XRE-Motive besteht aus der Basenabfolge 5'-GCGTG-3' (Denison et al., 1988; Denison et al., 1989). Durch die XRE-Bindung des AhR/ARNT Dimers kommt es zu lokalen Modifikationen der Chromatinstruktur, woraufhin Komponenten der generellen Transkriptionsmaschinerie an die DNA binden und die Expression des betreffenden Gens durch Rekrutierung der RNA Polymerase II aktivieren können (Morgan & Whitlock, Jr., 1992; Okino & Whitlock, Jr., 1995; Ko et al., 1996; Hankinson, 2005).

Nach Aktivierung der Genexpression wird der AhR mit Hilfe der Kernexport-Sequenz (NES) in das Zytosol transferiert, wo es nach Ubiquitinierung zum proteasomalen Abbau des AhR kommt (Davarinos & Pollenz, 1999; Ma & Baldwin, 2000; Ma & Baldwin, 2002). Auf diese Weise wird ein kontrolliertes Abschalten des AhR-Signalwegs nach Abbau oder Elimination des Liganden gewährleistet (Pollenz & Barbour, 2000).

Die durch den AhR modulierten Gene werden unter dem Begriff „AhR Genbatterie“ zusammengefasst (siehe Tab. 2) (Nebert et al., 2000). Klassische Zielgene des AhR kodieren für die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme der Phase I, wie CYP1A1, CYP1B1 oder ADH-3 und Vertreter der Phase II, beispielsweise GST Ya oder UGT1A6. Neben den Enzymen des Fremdstoffwechsels werden auch Gene, die an der Regulation von Apoptose, Zell-Proliferation und –Differenzierung beteiligt sind, durch den AhR moduliert (Puga et al., 2002; Elferink, 2003). Hierzu gehören z.B. das pro-apoptotische Gen *bax*, die Zell-Zyklus Regulatoren p21^{CIP1} und p27^{KIP1} oder Interleukine wie IL-2. Microarray-Analysen von TCDD-behandelten HepG2 Zellen ergaben ein verändertes Expressionsprofil von 310

bekanntesten Genen, von denen etwa 1/3 induziert und 2/3 reprimiert wurden (Puga et al., 2000). Auch wenn nicht jedes dieser Gene direkt als AhR-abhängig angesehen werden kann, lässt dieses Ergebnis auf eine Vielzahl XRE-regulierter Gene schließen.

Tab. 2 Beispiele AhR-regulierter Gene

(nach Bock und Köhle 2006, modifiziert)

Fremdstoffwechsel**- Enzyme**

CYP1A1	Cytochrom P450 1A1	Denison et al. 1988
CYP1A2	Cytochrom P450 1A2	Quattrochi et al. 1994
CYP1B1	Cytochrom P450 1B1	Tang et al. 1996
CYP2A5	Cytochrom P450 2A5 (Maus)	Arpiainen et al. 2005
CYP2S1	Cytochrom P450 2S1	Rivera et al. 2002
ALDH 3	Aldehyd Dehydrogenase 3	Vasiliou et al. 1999
GST Ya	Glutathion-S-Transferase Ya	Rushmore & Pickett 1990
UGT 1A1	UDP-Glucuronosoyltransferase 1A1	Yueh et al. 2003
UGT 1A6	UDP-Glucuronosoyltransferase 1A6	Münzel et al. 1998
NQO1	NAD(P)H:Oxidoreduktase	Jaisval 1991
PON 1	Paraoxonase 1	Gouedard et al. 2004

- Transkriptionsfaktoren

AhRR	AhR Repressor	Mimura et al. 1999
Nrf2	<i>NF-E2 p45 related factor</i>	Miao et al. 2005

Proliferation, Apoptose, Differenzierung

IL-2	Interleukin 2	Jeon & Esser 2000
IGFBP-1	<i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1</i>	Marchand et al. 2004
c-jun	AP1 Untereinheit	Hoffer et al. 1996
jun-D	AP1 Untereinheit	Hoffer et al. 1996
c-fos	AP1 Untereinheit	Duan et al. 1999
bax	<i>bcl2-associated protein X</i>	Matikainen et al. 2001
c-myc	Proto-Onkogen	Kim et al. 2000
HES-1	<i>Hairy and Enhancer of Split homolog 1</i>	Thomsen et al. 2004
EPO	Erythropoietin	Chan et al. 1999
NMT2	N-Myristoyltransferase	Kolluri et al. 2001
Filaggrin		Loertscher et al. 2002
Epiregulin		Patel et al. 2006

1.3 Der AhR Repressor (AhRR)

Der Arylhydrokarbon Rezeptor Repressor (AhRR) wurde 1999 entdeckt und als ein weiteres Zielgen der AhR/ARNT-Signalkaskade beschrieben (Mimura et al., 1999). Das translatierte Protein zeigt, mit Ausnahme der fehlenden PAS-B Subdomäne, die charakteristischen Strukturen eines bHLH-PAS Proteins auf. Besonders der N-terminale Bereich des AhRR Proteins weist starke Homologien zum AhR Molekül auf. Im Gegensatz zum AhR besitzt der AhRR jedoch keine Ligandenbindungsstelle. Im C-Terminus fehlt dem AhRR Molekül die glutaminreiche Transaktivierungsdomäne. Ektopische Überexpressionsanalysen zeigten, dass der AhRR in der Lage ist die 3-MC-induzierte CYP1A1 Expression zu inhibieren (Mimura et al., 1999). Auf Grund dieser Befunde postulierten Mimura und Kollegen, dass der AhRR eine Form der negativen Rückkopplung des AhR-Signalwegs darstellt. Derartige Rückkopplungsschleifen sind von verwandten bHLH-PAS Signalwegen bekannt. So wird die Expression des Clock Gens durch das translatierte Protein seines Zielgens Per moduliert (Dunlap, 1999). Die Expression des Inhibierenden-PAS Proteins (IPAS) wird durch HIF-1 α aktiviert, wodurch die Hypoxie-vermittelte Transkription supprimiert wird (Makino et al., 2007).

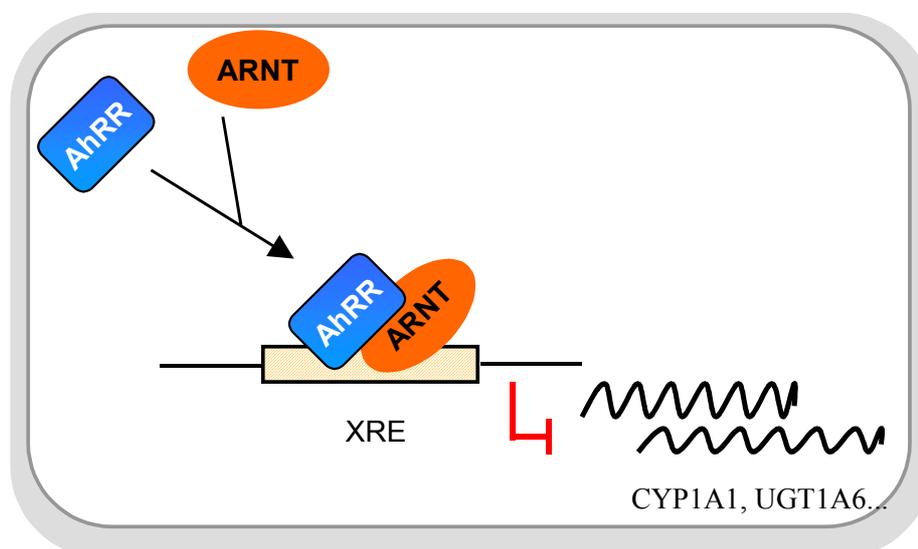


Abb. 3 Rolle des AhRR innerhalb der AhR-Signalkaskade.

Der AhRR dimerisiert im Zellkern mit ARNT und bindet an XRE-Motive. Auf Grund der fehlenden Transaktivierungsdomäne kommt es zu einer Inhibition der AhR- vermittelten Genexpression.

Die beobachtete inhibitorische Rückkopplung lässt sich durch den nachfolgenden Mechanismus erklären (Abb. 3): Der im Nukleus lokalisierte AhRR (Fetissov et al., 2004) bildet ein Heterodimer mit ARNT und ist in dieser Form fähig, an XRE-Motive zu binden (Mimura et al., 1999; Kikuchi et al., 2003). Auf Grund der fehlenden Transaktivierungsdomäne kommt es durch die AhRR/XRE-Bindung zu keiner gesteigerten transkriptionellen Aktivität. Der AhRR konkurriert auf diese Weise mit dem AhR um das gemeinsame Partnermolekül ARNT und um die Bindung der XRE-Motive (Mimura & Fujii-Kuriyama, 2003; Haarmann-Stemmann & Abel, 2006). Ob dieser postulierte Mechanismus auch in Abwesenheit eines überexprimierten AhRR Proteins abläuft, ist bisher nicht bewiesen worden. Hinweise auf eine physiologische Funktion des AhRR sind durch neuere Studien an Mammakarzinomzellen aufgekommen (Yang et al., 2005; Kanno et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass der AhRR in die Regulation von Wachstum und Differenzierung dieser Zellen involviert ist.

Das AhRR Gen wurde bisher im Erbgut von Mensch (Watanabe et al., 2001), Maus (Mimura et al., 1999), Ratte (Korkalainen et al., 2004) und diversen Fischarten nachgewiesen (Karchner et al., 2002; Evans et al., 2005; Roy et al., 2006). Durch die voranschreitende Sequenzierung verschiedener Genome wurden AhRR-homologe Gensequenzen in den Erbinformationen unserer nächsten Verwandten, den Primaten Schimpanse (XR_025349) und Rhesus-Affe (XR_014836), identifiziert (Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium, 2005; Rhesus Macaque Genome Sequencing and Analysis Consortium, 2007). Der AhRR Genlocus scheint folglich in der Tierwelt weit verbreitet zu sein.

Das AhRR Gen der Maus ist auf Chromosom 13, das der Ratte auf Chromosom 1 lokalisiert (Mimura et al., 1999; Nishihashi et al., 2006). Im Genom des Menschen befindet sich das AhRR Gen auf Chromosom 5 (Cauchi et al., 2003) und erstreckt sich über eine Länge von ca. 130kb. Das Gen besteht aus 12 Exons und kodiert ein 715 AS langes Protein. Die bHLH-Domäne des Proteins wird von Exon 3, die PAS-Domäne von Exon 5 und 6 kodiert (Fujita et al., 2002; Cauchi et al., 2003). Die cDNA des humanen AhRR wurde erstmals in einer aus Hirngewebe gewonnenen cDNA-Bank identifiziert (Nagase et al., 1999). Über die transkriptionelle Aktivierung des humanen AhRR sind keine experimentellen Daten vorhanden. Computer-gestützte Analysen zeigten die Existenz putativer XRE- und GC Box-Motive sowie einer NF- κ B-Seite im Intron 1 des Gens auf (Cauchi et al., 2003). Das AhRR Gen der Maus wird durch jeweils drei funktionelle XRE- und GC Box-Motive in der 5'-

Enhancer-Region reguliert (Baba et al., 2001). Weiterhin konnte an Hand von Reporter-Gen-Analysen die Responsivität des murinen AhRR gegenüber Phorbol ester gezeigt werden, was für ein funktionelles NF- κ B-Bindemotiv spricht (Baba et al., 2001).

Expressionsanalysen des AhRR aus Proben verschiedener Gewebe und Organe von Mensch, Maus und Ratte zeigten, dass die Transkription des AhRR organspezifisch reguliert ist (Huang et al., 2003; Tsuchiya et al., 2003a; Korkalainen et al., 2004; Yamamoto et al., 2004; Bernshausen et al., 2006; Nishihashi et al., 2006). Beim Menschen konnte die Expression des AhRR beispielsweise in Lunge, Leber, Darm und Niere nachgewiesen werden (Tsuchiya et al., 2003a; Yamamoto et al., 2004). Die höchste Expression wurde in Hoden und Pankreas gemessen (Tsuchiya et al., 2003a; Yamamoto et al., 2004). Yamamoto und Kollegen konnten zeigen, dass der AhRR in Organen von humanen Föten im Vergleich zu adulten Geweben relativ gering exprimiert wird, was für eine vom Stadium der Entwicklung abhängige Regulation der AhRR Expression spricht (Yamamoto et al., 2004).

Genetische Analysen zeigten die Existenz von mindestens vier verschiedenen Polymorphismen des AhRR Gens auf. Einige dieser Polymorphismen wurden mit Krankheiten wie Lungenkrebs, Endometriose und männlicher Infertilität in Verbindung gebracht (Watanabe et al., 2001; Fujita et al., 2002; Cauchi et al., 2003; Watanabe et al., 2004; Soneda et al., 2005; Tsuchiya et al., 2005). Diese Zusammenhänge konnten jedoch auf Grund unzureichender Daten und fehlendem Bezug zur Exposition gegenüber Umweltchemikalien nicht hinreichend belegt werden (Guo, 2006; Haarmann-Stemann & Abel, 2006).

1.4 Der AhR Nuklear Translokator (ARNT)

Der AhR Nuklear Translokator (ARNT) stellt ein bHLH-PAS Protein der Klasse 2 dar und ist Dimerisierungspartner für viele Klasse 1 Moleküle wie z.B. AhR, AhRR und HIF-1 α (Mimura et al., 1999; Tomita et al., 2000; Wang et al., 2006). Es besitzt neben den typischen bHLH- und PAS-Domänen ein nukleäres Lokalisationssignal und eine im C-Terminus lokalisierte glutaminreiche Transaktivierungsdomäne (Jain et al., 1994; Whitelaw et al., 1994). Man geht davon aus, dass die Transaktivierungsdomäne von ARNT maßgeblich an der AhR-medierten Genexpression beteiligt ist (Kobayashi et al., 1997). Es konnte gezeigt

werden, dass ARNT an E-Boxen (generelle Bindungsmotive von bHLH-PAS Proteinen) binden und so die Expression von Genen aktivieren kann (Antonsson et al., 1995). Die funktionelle Bedeutung transkriptionell aktiver ARNT Homodimere ist bisher nicht bekannt (Sogawa et al., 1995; Swanson et al., 1995; Levine & Perdew, 2002). Ein Ausschalten von ARNT führt *in vivo* zu letalen Schäden (siehe Abschnitt 1.1). In Experimenten mit konditionierten ARNT-defizienten Tieren kommt es zum Verlust der AhR- und Hypoxie-abhängigen Genexpression (Tomita et al., 2000).

1.5 Das Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1)

Das Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) ist das klassische Zielgen des AhR-Signalwegs (Whitlock, Jr., 1999). Es gehört zur großen Gruppe der Häm-enthaltenden P450 Monooxygenasen die ihren Namen dem Absorptionsmaximum der Kohlenmonoxid-gebundenen Form bei 450nm verdanken. Die zur Phase I des Fremdstoffwechsels gehörenden Cytochrom P450 Enzyme oxidieren zahlreiche Hormone und lipophile Fremdstoffe und erhöhen dadurch die Wasserlöslichkeit dieser Substanzen (Ioannides & Lewis, 2004). Die oxidierten Gruppen werden durch Phase II Enzyme mit weiteren hydrophilen Molekülen wie Glutathion oder Zuckerresten konjugiert und können schließlich aus der Zelle eliminiert und über den Harn ausgeschieden werden. Neben diesen katabolen Abläufen kann es durch CYP-medierte Reaktionen zur Aktivierung einer Substanz, z.B. eines Arzneimittels oder eines Kanzerogens, kommen (Ioannides & Lewis, 2004). Eine für das CYP1A1 Isozym typische Reaktion ist die Oxidation des PAK B(a)P (Gelboin, 1980; Pelkonen & Nebert, 1982). Durch Einfügen eines Sauerstoffatoms kommt es zur Bildung eines Epoxids. Dieses kann wiederum von der Epoxidhydrolase in zwei Alkoholgruppen gespalten werden. Durch eine weitere CYP1A1-katalysierte Oxidation wird erneut ein Epoxid gebildet, es entsteht das ultimale Kanzerogen B(a)P-7,8-diol-9,10-epoxid. Dieses ist in der Lage DNA-Addukte zu bilden und somit permanente Veränderungen des Erbguts zu induzieren.

1.6 Der Hypoxie-Induzierbare Faktor (HIF-1 α)

Der Hypoxie-Induzierbare Faktor (HIF-1 α) wurde 1991 von Semenza und seinen Mitarbeitern entdeckt und ist ein Mitglied der bHLH-PAS Proteine (Semenza et al., 1991;

Wang et al., 1995). Dieses Protein wird durch Hypoxie, ein Zustand indem der intrazelluläre Sauerstoffpartialdruck unter 5% fällt, aktiviert und ist vorrangig für die Vaskularisierung, und damit für Prozesse wie Wundheilung, Embryogenese und Tumorwachstum essentiell (Semenza, 2000; Hickey & Simon, 2006). Die Synthese des HIF-1 α Proteins läuft auch unter normoxischen Bedingungen ab. Allerdings wird das HIF-1 α Protein direkt durch die Prolylhydroxylase hydroxyliert, von dem Von-Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein erkannt und schließlich durch das 26S Proteasom degradiert. Bei Eintritt hypoxischer Konditionen wird das HIF-1 α Protein stabilisiert und in den Zellkern transloziert, wo es mit ARNT (HIF-1 β) dimerisiert. Das resultierende Heterodimer bindet an Hypoxie-responsive Elemente (HREs) innerhalb regulatorischer Gensequenzen und induziert so die Expression der betreffenden Gene (Semenza, 1998; Wenger, 2000). Der Ablauf dieser Signalkaskade kann auch durch pharmakologische Hemmung der Prolylhydroxylase (z.B. mit dem Eisenchelator Desferrioxamin, DFX) stimuliert werden (Wang & Semenza, 1993; Epstein et al., 2001). Klassische Zielgene der Hypoxie-Kaskade sind der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), Erythropoietin und eine Reihe von glykolytischen Enzymen. Die resultierenden Genprodukte sollen der Zelle bzw. dem Gewebe eine Adaptation an die niedrigen Sauerstoffverhältnisse ermöglichen.

Es wurde beobachtet, dass die konstitutive und induzierbare Expression von AhR-Zielgenen durch hypoxische Bedingungen inhibiert wird (Gassmann et al., 1997; Kim & Sheen, 2000; Nie et al., 2001). Auch die Aktivitäten XRE-getriebener Reporter-Gene werden unter Hypoxie herabreguliert. Eine in der Literatur kontrovers diskutierte Erklärung für diese Beobachtungen ist die mögliche Konkurrenz der aktivierten AhR- und HIF-1 α -Proteine um den gemeinsamen Bindungspartner ARNT (Gradin et al., 1996; Chan et al., 1999; Pollenz et al., 1999). Da jedoch keine Beeinflussung hypoxisch-aktivierter Gene durch die Exposition mit Dioxin beobachtet wurde, setzt diese Theorie voraus, dass HIF-1 α eine höhere Affinität zu ARNT besitzt als der AhR. Der genaue Mechanismus dieser Interferenz zwischen AhR- und Hypoxie-Signalweg ist bisher nicht bekannt.

1.7 Epigenetische Mechanismen der Genregulation

Die Genexpression steht nicht nur in Abhängigkeit vorhandener positiv oder negativ agierender Transkriptionsfaktoren, sondern hängt in erster Linie von der Zugänglichkeit der

regulatorischen Bereiche eines Gens ab. Die DNA einer Zelle liegt in Form einer kompakten, perlenkettenartigen Struktur vor, die als Chromatin bezeichnet wird (Kleinig & Sitte, 1999; Davie, 2003). Die repetitiven Substrukturen des Chromatins werden als Nukleosomen bezeichnet. Diese bestehen aus einem oktameren Komplex von Histonmolekülen (je zwei Moleküle H2A, H2B, H3 & H4), um die sich die DNA-Helix linksgängig ca. 1,7 mal windet.

Die Bindungsstärke zwischen Histonen und DNA hängt von dem Acetylierungsstatus der Histone ab. Liegen die Histone nicht acetyliert vor, interagieren räumlich herausragende positive Lysinreste mit der negativen Partiaalladung des DNA Rückgrats und führen zu einem geschlossenen Zustand. Durch Acetylierung der Histone werden die positiven Lysinreste neutralisiert, und die DNA/Histon-Bindung wird aufgelockert. Für die Acetylierung der Histone sind Histon Acetylasen (HATs) verantwortlich, die von Transkriptionsfaktoren und Co-Aktivatoren rekrutiert werden können (Marmorstein, 2001; Davie, 2003). Die resultierende offene Chromatinstruktur begünstigt somit die Genexpression. Der Gegenspieler der HATs sind die Histon Deacetylasen (HDACs) (Grozingler & Schreiber, 2002; Davie, 2003; De Ruijter et al., 2003). Diese Enzyme werden häufig von inhibitorischen DNA-bindenden Faktoren (Co-Repressoren, z.B. mSin3A) rekrutiert und führen zu einer Deacetylierung der Histone und damit zu einem geschlossenen Zustand des Chromatins, der mit dem Abbruch der Genexpression einhergeht (Hassig et al., 1997; Ng & Bird, 2000; Grozingler & Schreiber, 2002). Der Acetylierungsgrad des Chromatins korreliert häufig mit einem weiteren epigenetischen Faktor, dem Methylierungszustand der DNA. So führt die von DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysierte Methylierung von Cytosinresten (CpG-Inseln) in regulatorischen Bereichen eines Gens zu der sequenziellen Rekrutierung von methylbindenden Proteinen (MeCPs) und HDACs und somit zum Ende der Transkription (Nan et al., 1998; Ng & Bird, 1999). Die Methylierung von Cytosinresten der DNA stellt die Basis für fundamentale Prozesse wie die X-Chromosom-Inaktivierung oder das Allel-spezifische Imprinting dar (Li, 2002).

Viele Tumorerkrankungen sind mit einer Dysregulation von HDAC-Enzymen und/oder einem aberrierenden Muster der DNA-Methylierung verbunden (Baylin et al., 2001; Jones & Baylin, 2002). Interessanterweise ist es möglich, sowohl DNMT als auch HDAC Enzyme pharmakologisch zu inhibieren und somit Einfluss auf die Genexpression zu nehmen (Grozingler & Schreiber, 2002; Davie, 2003). Häufig geht die Hemmung eines der beiden Enzyme mit der Hemmung des anderen Enzyms einher (Razin, 1998; Selker, 1998).

1.8 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es den humanen AhRR molekularbiologisch und biochemisch zu charakterisieren. Untersuchungen an verschiedenen humanen transformierten Zelllinien und primären Zellen sollen einen Einblick in die transkriptionelle Modulation, die Expressionsraten und die zelluläre Funktion des AhRR ermöglichen.

Im Einzelnen sollen folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Gibt es Unterschiede in der Höhe und Induzierbarkeit der AhRR Genexpression in den untersuchten humanen Zelllinien? Korreliert die AhRR Expression mit der konstitutiven und/oder der induzierbaren Genexpression von CYP1A1?
2. Wie wird der AhRR auf transkriptioneller Ebene reguliert? An welcher Position sind die funktionellen XRE-Motive des humanen AhRR Gens lokalisiert? Gibt es responsive Bindungsstellen für weitere Transkriptionsfaktoren, die an der Genregulation des AhRR beteiligt sein könnten?
3. Kann der postulierte Rückkopplungsmechanismus für den humanen AhRR bestätigt werden? Besitzt der AhRR einen Einfluss auf die basale Transkription von AhR-Zielgenen wie CYP1A1? Interagiert der AhRR mit Molekülen, die Histon Deacetylase Aktivitäten aufweisen? Greift der AhRR somit in Prozesse der epigenetischen Genmodulation ein?
4. Wird die mRNA Expression des AhR-Zielgens AhRR durch die Aktivierung der hypoxischen Signalwege beeinflusst? Gibt es Hinweise auf eine direkte Genregulation durch HIF-1 α oder andere hypoxiesensitive Transkriptionsfaktoren?

Die gewonnenen *in vitro* Befunde sollen Aufschluss über regulatorische und funktionelle Mechanismen liefern, die Grundlage für weiterführende Studien darstellen sollen. Fernziel ist es, die physiologische Funktion des AhRR Moleküls in den Abläufen des Fremdstoffwechsels und des Zellwachstums zu charakterisieren.

2 Material & Methoden

Allgemeines

Die verwendeten Chemikalien besaßen p.a. Qualität. Soweit nicht anders vermerkt wurden diese Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe) oder Fluka (Neu-Ulm) bezogen. Medien, Puffer und andere Lösungen wurden mit Reinstwasser angesetzt, welches über eine Millipore-Anlage (Schwalbach) aufbereitet worden war. Lösungen die für ChIP-Analysen und RNA-Arbeiten notwendig waren wurden mit DEPC-Wasser angesetzt. Oligonukleotide und siRNAs wurden (wenn nicht anders vermerkt) von MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

2.1 Zellkultur

2.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden verschiedene, adhärent wachsende humane Zelllinien eingesetzt. Verwendet wurden die drei transformierten Zelllinien HepG2, A549 und HeLa sowie primäre Fibroblasten. Alle Zellen wurden unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Das Kulturmedium wurde jeden dritten Tag gewechselt. Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 90% wurden die Zellen subkultiviert. Das Nährmedium wurde abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2ml Accutase für 5min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit Medium abgespült und auf neue Kulturgefäße verteilt.

Nährmedien:

- HepG2, Hepatokarzinomzelllinie
RPMI 1640, 10% (v/v) FCS, 5% NaHCO₃ (v/v), 50.000U A/A
- A549, epitheliale Lungenkarzinomzelllinie
DMEM, 10% (v/v) FCS, 2mM Glutamin, 50.000U A/A

- HeLa, epitheliale Zervixkarzinomzelllinie
RPMI 1640, 10% (v/v) FCS, 5% NaHCO₃ (v/v), 50.000U A/A
- Fibroblasten, primäre, isoliert aus menschlicher Vorhaut (AG Grether-Beck, IUF)
MEME, 10% FCS, 2mM Glutamin, 50.000U A/A

RPMI 1640, DMEM (*low glucose*), Accutase, Antibiotika / Antimykotika (A/A) [10.000 U/ml] und Fötales Kälberserum (FCS) wurden von PAA (Cölbe) bezogen. *Phosphate Buffered Saline* (PBS) und L-Glutamin [200mM] von Gibco (Invitrogen). Das MEME Medium stammte von Sigma-Aldrich, das Natriumhydrogencarbonat (7,5% (w/v)) von der Biochrom AG (Berlin).

2.1.2 Belastung der Zellen

Die Belastung der Zellen erfolgte ca. 20h nach Einsaat an semikonfluenten Monolayer-Kulturen. Für RT-PCR-Analysen und Transfektionen wurden die Zellen in 6-Well-Platten eingesät. Für CHIP- und Protein-Analysen in großen Kulturflaschen (175cm²). Die Zellen wurden jeweils 24h vor der Belastung ausgesät. Die Belastung erfolgte in Vollmedium.

<u>Substanz</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Lösungsmittel</u>
Desferrioxamin (Sigma-Aldrich)	300µM	gelöst in H ₂ O
Mithramycin A (AppliChem ¹)	150nM	gelöst in H ₂ O
Benzo(a)pyren (Sigma-Aldrich)	10µM	gelöst in THF
3-Methylcholanthren (Sigma-Aldrich)	10µM	gelöst in DMSO
3'-Methoxy-4'-Nitroflavon (Symrise ²)	10µM	gelöst in DMSO
Natrium-Butyrat (Sigma-Aldrich)	10mM	gelöst in H ₂ O
5'-Azacytidin (Sigma-Aldrich)	10µM	gelöst in H ₂ O
SN50 Inhibitor Peptid (Calbiochem ³)	50µg/ml	gelöst in H ₂ O

¹ Darmstadt, ² Holzminden, ³ San Diego, CA, USA

2.2 Isolation, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.2.1 Isolation von Gesamt-RNA

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des peqGold Total RNA Kits (Peqlab, Erlangen) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die RNA-Aufreinigung wurde mit einem *DNase* I-Verdau (Qiagen, Hilden) kombiniert um mögliche Kontaminationen mit DNA zu vermeiden.

2.2.2 Isolation von Plasmid-DNA

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Kulturen wurde mit Hilfe des QIAprep Plasmid Purification Kits (mini/midi; Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.3 Isolation von genomischer DNA

Zur Gewinnung genomischer DNA aus humanen Zellen wurde das QIAamp DNA Kit (Qiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach beiliegendem Protokoll.

2.2.4 Aufreinigungen von DNA

Zur Aufreinigung von DNA wurden, je nach Verwendungszweck, verschiedene Techniken eingesetzt. Geschnittene DNA-Fragmente oder Vektoren wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, die gewünschte Bande wurde herausgeschnitten, und die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Elution Kits nach Herstellerangaben rückgewonnen. Die Aufreinigung von DNA-Proben zum weiteren Einsatz in ChIP-Analysen erfolgte mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion (Sambrook et al. 1989). Alle übrigen Aufreinigungsschritte von DNA wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) durchgeführt.

2.2.5 Gelelektrophorese von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte in EtBr-haltigen nativen Agarosegelen (0,8% - 2% (w/v)) (Sambrook et al. 1989). Als Puffersystem wurde 1x TBE verwendet. Die DNA-Proben wurden mit einem Bromphenol Blau/Xylencyanol-enthaltenden Ladepuffer beschwert (6-fach). Die Spannung wurde so gewählt, dass sie zwischen 5-7V/cm Gellänge lag. Die Visualisierung der Banden erfolgte an einem Fluor-S-MAX Gerät (Bio-Rad, München). Zur Größenabschätzung der DNA wurde ein 100bp DNA Marker (50bp – 1kb; AppliChem) bzw. ein 1kb DNA Marker (1kb – 10kb; Roche) mit auf das Gel aufgetragen.

2.2.6 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Die Konzentration der präparierten Nukleinsäuren wurde photometrisch mit Hilfe des GeneQuant II Gerätes (Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmt. Für die Messungen wurden die DNA- oder RNA-Proben im Verhältnis 1:10 bis 1:50 mit DEPC-Wasser verdünnt.

2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) -Techniken

2.3.1 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA erfolgte nach Vogel et al. (1997) mit Hilfe des MMLV-Reverse Transkriptase Enzyms (*Moloney-Murine-Leukemia-Virus*). Dieses Enzym besitzt im Gegensatz zur ebenfalls häufig verwendeten AMV-Reversen Transkriptase (*Avian-Myoblastosis-Virus*) keine DNA-abhängige DNA Polymerase-Aktivität. Des Weiteren ist die RNase H-Aktivität der MMLV-Reversen Transkriptase deutlich geringer als die des AMV-Enzyms, so dass sie weniger mRNA-Moleküle hydrolysiert (Schrimpf, 2002).

Ein Mikrogramm der isolierten Gesamt-RNA wurde mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 15,5µl verdünnt. Nach Zugabe von 2µg oligo(dT₁₅)-Primern (Roche, Mannheim) sowie 0,5mM dNTPs (Peqlab) erfolgte ein fünfminütiges Annealing bei 65°C. Anschließend wurde die Reaktion auf 4°C abgekühlt und die RNA in einem Endvolumen von 40µl durch Zusatz

von 400U MMLV Reverser Transkriptase (Invitrogen) für 52min bei 37°C in cDNA umgeschrieben. Neben der MMLV enthielt ein Ansatz 8µl 5x RT-Puffer, 30U RNase Inhibitor (Eppendorf, Hamburg) und 4µl DTT [0,1mM]. Zum Abbruch der Synthesereaktion wurde die Reverse Transkriptase durch zehnminütige Inkubation bei 70°C inaktiviert. Die so erhaltenen cDNA-Proben wurden direkt in die qRT-PCR eingesetzt oder alternativ bei -20°C aufbewahrt.

2.3.2 Standard PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Technik die es ermöglicht, gezielte DNA-Bereiche *in vitro* exponentiell zu amplifizieren. Der zu amplifizierende Bereich der Matrizen-DNA (*Template*) wird von zwei komplementären Oligonukleotiden (*Primern*) mit freien 3'-OH-Enden eingegrenzt. Die PCR läuft in drei temperaturabhängigen Schritten ab. Diese drei Schritte, ein Zyklus, werden 30-40 mal wiederholt. Der erste Schritt ist die Hitze-Denaturierung der Template-DNA bei 94°C. Hierbei trennen sich dsDNA-Moleküle zu Einzelsträngen auf. Es folgt das Annealing. Der Reaktionsansatz wird auf eine Temperatur abgekühlt, die ca. 5°C unter der Schmelztemperatur (T_m) der Primer liegt. Bei dieser Temperatur hybridisieren die Primer an komplementäre Regionen des Matrizen-Stranges. Nach dem Annealing folgt die Elongation. Ausgehend vom 3'-OH-Ende der Primer repliziert eine hitzestabile DNA-Polymerase den einzelsträngigen DNA-Strang. Häufig verwendete hitzestabile DNA-Polymerasen sind die *Taq*-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus*) und die *Pwo*-Polymerase (aus *Pyrococcus woesei*). Die entstandenen doppelsträngigen DNA-Moleküle dienen im nächsten Zyklus wiederum als Matrize für die DNA-Polymerase. Auf diese Weise steigt die Konzentration des gewünschten DNA-Abschnitts im Ansatz exponentiell an. Die PCR-Reaktionen wurden in einem TRIO-Thermoblock (Biometra, Göttingen) oder dem Robocycler Gradient (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt.

Taq-PCR: Für ChIP-Analysen und Herstellung von Standards für die qRT-PCR wurde *Taq*-DNA Polymerase (Qiagen) eingesetzt. Ein Standardansatz setzte sich zusammen aus:

X μ l	Template
2,5 μ l	Primer FP [4 μ M]
2,5 μ l	Primer RP [4 μ M]
2,5 μ l	10x PCR Reaktionspuffer
1 μ l	dNTPs [je 10mM]
0,4 μ l	<i>Taq</i> -Polymerase [5U/ μ l]
ad. 25 μ l Wasser	

Pwo-PCR: Für Klonierungen und die Bisulfit-Modifikation von DNA wurde eine DNA Polymerase mit zusätzlicher 3'-5'-Exonucleaseaktivität (*proof-reading*) verwendet, die *Pwo*-Polymerase (Peqlab). Im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase (72°C) beträgt die Elongationstemperatur dieser Polymerase 68°C. Ein Ansatz setzte sich zusammen aus:

X μ l	Template
2,5 μ l	Primer FP [4 μ M]
2,5 μ l	Primer RP [4 μ M]
2,5 μ l	10x Reaktionspuffer komplett
1 μ l	dNTPs [je 10mM]
2 μ l	<i>Pwo</i> -Polymerase [2U/ μ l]
ad. 25 μ l Wasser	

2.3.3 Quantitative *Real-Time* PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist eine Variante der herkömmlichen PCR-Technik, die es ermöglicht die Expression eines Gens in „Echtzeit“ zu verfolgen. Die bei der PCR entstehenden dsDNA-Moleküle werden durch einen interkalierenden Farbstoff (SYBR Green) angefärbt. Das PCR-

Gerät misst die bei jedem PCR-Zyklus zunehmende Fluoreszenz der Probe und berechnet den Eintritt der Reaktion in die exponentielle Phase (*Crossing Point*). Das Software-System kann, bezugnehmend auf Standardproben (mit bekannter Anzahl enthaltender cDNA Moleküle), die relative Kopienanzahl in jeder Probe berechnen. Die in dieser Arbeit durchgeführten qRT-PCR-Reaktionen wurden mit Hilfe des SYBR Green Kits (Qiagen) in einem LightCycler Instrument (Roche) durchgeführt. Standardmäßig wurden 2µl cDNA pro PCR-Ansatz eingesetzt. Die gefahrenen Zyklenzahl variierte zwischen 35 und 45.

Für die qRT-PCR verwendete Oligonukleotide:

AhRR (Fritsche et al., 2005) Produktlänge: 161bp	FP 5'-CAGTTACCTCCGGGTGAAGA-3' RP 5'-CCAGCGCAAAGCCATTAAGA-3' Annealing-Temperatur: 60°C
β-Aktin (Ihm et al., 2002) Produktlänge: 263bp	FP 5'-CCCCAGGCACCAGGGCGTGAT-3' RP 5'-GGTCATCTTCTCGCGGTTGGCCTTGGGGT-3' Annealing-Temperatur: 60°C
CYP1A1 (Omiecinski et al., 1990) Produktlänge: 150bp	FP 5'-TAGACACTGATCTGGCTGCAG-3' RP 5'-GGGAAGGCTCCATCAGCATC-3' Annealing-Temperatur: 60°C
c-Myc (Yang et al., 2005) Produktlänge: 116bp	FP 5'-ACCACCAGCAGCGACTCTGA-3' RP 5'-TCCAGCAGAAGGTGATCCAGACT-3' Annealing-Temperatur: 56°C
CYP1A2 (Finnström et al., 2001) Produktlänge: 86bp	FP 5'-GTTCTGCAGAAAACAGTCCA-3' RP 5'-CTGTGCTTGAACAGGGCA-3' Annealing-Temperatur: 58°C
VEGF (Hasebe et al., 2003) Produktlänge: 69bp	FP 5'-TGCAAAAACACAGACTCGCG-3' RP 5'-TGTCACATCTGCAAGTACGTTTCG-3' Annealing-Temperatur: 54°C
HIF-1α Produktlänge: 146bp	FP 5'-CCCTAACTAGCCGAGGAAGAA -3' RP 5'-CAGCACCAAGCAGGTCATAG -3' Annealing-Temperatur: 60°C
Sp1 Produktlänge: 183bp	FP 5'-TGCAGCAGAATTGAGTCACC-3' RP 5'-TTGGTACTGCTGCCACTCTG-3' Annealing-Temperatur: 52°C

2.4 Restriktionsverdau von DNA

Zur Restriktion von dsDNA wurden bakterielle Restriktionsendonukleasen des Typs II eingesetzt. Restriktionsenzyme dieser Klasse erkennen spezifische, meist palindromische Tetra- oder Hexanukleotidsequenzen innerhalb der dsDNA. Die Enzyme binden und schneiden die dsDNA an bzw. in der Erkennungssequenz. Hierbei entstehen je nach verwendetem Restriktionsenzym glatte (*blunt-ends*) oder überhängende Enden (*sticky-ends*). Ein Verdau enthielt 250ng – 1µg DNA, 5U des Restriktionsenzym, den geeigneten SureCut-Reaktionspuffer (Sigma-Aldrich) sowie die für einige Enzyme notwendige Menge an Rinderserum Albumin (BSA). Der Verdau erfolgte für 1-1,5h am Temperaturoptimum des Restriktionsenzym. Die Effizienz der Restriktion wurde über eine Agarosegel (Abschnitt 2.2.5) überprüft. Die geschnittenen DNA-Produkte wurden wie unter Punkt 2.2.4 beschrieben aus dem Gel eluiert.

In dieser Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen:

(New England Biolabs, Beverly, MA, USA; Boehringer, Mannheim)

<u>Enzym</u>	<u>Schnittstelle</u>	<u>Temperaturoptimum</u>
<i>Alu</i> I	5'-AG [^] CT-3'	37°C
<i>Bam</i> H I	5'-G [^] GATCC-3'	37°C
<i>Bgl</i> II	5'-A [^] GATCT-3'	37°C
<i>Bss</i> H II	5'-G [^] CGCGC-3'	50°C
<i>Dpn</i> I	5'-GA ^{(CH₃)[^]} TC-3'	37°C
<i>Eco</i> R I	5'-G [^] AATTC-3'	37°C
<i>Eco</i> R V	5'-GAT [^] ATC-3'	37°C
<i>Hind</i> III	5'-A [^] AGCTT-3'	37°C
<i>Kpn</i> I	5'-GGTAC [^] C-3'	37°C
<i>Nla</i> III	5'-CATG [^] -3'	37°C
<i>Pvu</i> II	5'-CAG [^] CTG-3'	37°C
<i>Sal</i> I	5'-G [^] TCGAC-3'	37°C
<i>Sma</i> I	5'-CCC [^] GGG-3'	25°C
<i>Xba</i> I	5'-T [^] CTAGA-3'	37°C
<i>Xho</i> I	5'-C [^] TCGAG-3'	37°C

Die Deletionskonstrukte *pAhRR-Δ1* bis *pAhRR-Δ4* wurden durch einen Restriktionsverdau des *pAhRR* Vektors und anschließender Religation produziert. Die durchgeführten Restriktionen des *pAhRR* Plasmids können mit Hilfe der schematischen Darstellung des inserierten DNA-Fragments (Abb. 4) nachvollzogen werden.

<u>Konstrukt</u>	<u><i>pAhRR</i> geschnitten mit:</u>
<i>pAhRR-Δ1</i>	<i>Bgl</i> II + <i>Pvu</i> II
<i>pAhRR-Δ2</i>	<i>Kpn</i> I + <i>Pvu</i> II
<i>pAhRR-Δ3</i>	<i>Bgl</i> II + <i>BssH</i> II
<i>pAhRR-Δ4</i>	<i>Kpn</i> I + <i>BssH</i> II

Nach den Doppelverdau wurden die Ansätze elektrophoretisch aufgetrennt und die offenen Vektoren mit Hilfe der Gelelektion (Abschnitt 2.2.4) zurückgewonnen. Die Enden der geschnitten Vektoren wurden mit Hilfe des DNA Blunting Kits (Takara, Japan) geglättet. Durch Einsatz einer Polynukleotidkinase (Roche) wurden die 5'-Enden in Gegenwart von ATP phosphoryliert um die gewünschte Religation der Vektoren zu ermöglichen.

Das Deletionskonstrukt *pAhRR-Δ5* wurde durch eine Restriktion des *pAhRR-Δ2* Konstruktes mit den Enzymen *Bgl* II und *BssH* II generiert.

2.6 Allgemeine Techniken zur Klonierung

2.6.1 Dephosphorylierung von DNA

Um Religationen geschnittener Vektoren zu vermeiden, wurde nach der Linearisierung des Vektors die 5'-Phosphatgruppen mit Hilfe einer Alkalischen Phosphatase (Boehringer) entfernt. Nach Zugabe der entsprechenden Menge Reaktionspuffer (20mM Tris/HCL, pH 8, 10mM MgCl₂) wurden dem Ansatz 0,2U Alkalische Phosphatase pro µg DNA zugesetzt und für 1h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Phosphatase für 15min bei 65°C inaktiviert. Die Vektor-DNA wurde aus dem Ansatz gefällt, getrocknet und in H₂O rückgelöst.

2.6.2 Ligation

Die Ligation wurde mit Hilfe der T4 DNA Ligase (Peqlab) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro Reaktion wurden 50ng bis 100ng DNA und 1U T4 DNA Ligase eingesetzt. Das molare Verhältnis von Vektor zu DNA-Fragment variierte von 1:1 bis 1:4. Die Ligation erfolgte für 3h bei RT° oder alternativ bei 4-8°C ü.N.

2.6.3 Transformation

Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Hitzeschock-Verfahrens in die kompetenten Bakterien transformiert (Sambrook et al., 1989). Pro Transformationsansatz wurden 50µl *E.coli* Suspension eingesetzt. Diese wurden auf Eis aufgetaut und anschließend für 10min mit β-ME in einer Endkonzentration von 24mM inkubiert. Danach wurde der Ligationsansatz hinzu pipettiert. Der Ansatz wurde 30min auf Eis inkubiert, dann für 30s in einem 42°C warmen Wasserbad inkubiert und anschließend sofort für 2min in einem Eisbad abgekühlt. Nach der Zugabe von 900µl NZY⁺- oder LB-Kulturmedium (ohne Antibiotika) wurden die Zellen für 1h bei 37°C und ca. 225rpm im Schüttel-Inkubator angezogen. Nach der einstündigen Inkubation wurden 100µl und 200µl des Transformationsansatzes auf Antibiotika-haltige LB-Agarplatten (Amp oder Kan, abhängig von Bakterien-Stamm und Vektor) ausgestrichen. Die Platten wurden invertiert und ü.N. bei 37°C inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden mit einem autoklavierten Zahnstocher abgenommen und in 3-5ml LB-Kulturmedium (incl. Antibiotikum) bei 37°C ü.N. angezogen. Die Plasmide wurden mit Hilfe des QIAprep Plasmid Purification Mini Kits isoliert (Abschnitt 2.2.2), anschließend zur Kontrolle des inserierten Fragments mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten (Abschnitt 2.4) und elektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt 2.2.5). Bei richtiger Insertion wurden 100ml LB-Medium mit 1-2ml der Vorkultur angeimpft und ü.N. kultiviert. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte nun wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben mit der Midi Variante des entsprechenden Kits.

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Bakterien-Stämme:

- XL1-Blue MRF' Kan Supercompetent Cells (Stratagene)
Genotyp: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F^+ proAB lacI^q \Delta M15 Tn5 (Kan^r)]$
- XL1-Blue MRF' Supercompetent Cells (Stratagene)
Genotyp: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F^+ proAB lacI^q \Delta M15 Tn10 (Tet^r)]$
- Multishot Top10 Chemically Competent *E.coli* (Invitrogen)
Genotyp: F- *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG$

Für Bakterienkulturen verwendete Nährmedien:

LB-Agar	(Roth)
LB-Medium	(Roth)
NZY ⁺ -Medium	10g Casein Hydrolysat, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl, H ₂ O ad. 1l nach dem Autoklavieren wurden folgende sterile Lösungen zugegeben: 12,5ml 1M MgCl ₂ , 12,5ml 1M MgSO ₄ , 20ml 20% (w/v) Glukose

2.7 Transfektion eukaryotischer Zellen

2.7.1 Transfektion von Plasmid-DNA

Zur Transfektion von Plasmid-DNA wurden 2×10^5 Zellen / 6-Well-Kammer eingesät. Die Zellen wurden ü.N. unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden dann mit 2µg bis 5µg Vektor-DNA unter Zuhilfenahme des Transfektionsreagenzes Fugene 6 (Roche) in serumfreien Medium transfiziert (Verhältnis DNA zu Fugene 2:3). Bei der Durchführung wurde sich an die Herstellerangaben gehalten. Nach 4-5h wurde das Transfektionsgemisch entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Kulturmedium mit FCS zugegeben. Neben den unter Punkt 2.5 genannten Plasmiden wurden zusätzlich folgende Vektoren benutzt:

Zwei weitere Plasmide aus dem Intron 1 des humanen AhRR Gens (Kohli, 2006):

<i>pAhRR-2</i>	+37.922 bis +39.722	(2 XRE-Motive)
<i>pAhRR-3</i>	+38.991 bis +39.723	(1 XRE-Motiv)

2.7.2 RNA Interferenz

Die siRNA-Technik ist eine moderne Methode zum Ausschalten eines Gens. Diese Technik macht sich einen Schutzmechanismus von eukaryotischen Zellen zu Nutze (Fire et al., 1998; Hutvagner, 2005). Gelangt dsRNA, etwa durch Befall von Retroviren, in die Zelle, so wird diese durch so genannte DICER Moleküle erkannt. DICER Moleküle besitzen *RNase III*-Aktivität und spalten die gebundenen dsRNA Moleküle in 21bp - 22bp lange Fragmente, so genannte siRNAs (*short interfering RNAs*). Nach einer Phosphorylierung am 5'-Ende werden diese Fragmente in den RISC-Proteinkomplex (*RNA-induced silencing complex*) aufgenommen. Ein Strang wird fest in den RISC integriert, wodurch die Spezifität des Komplexes gegenüber einer komplementären mRNA determiniert wird. Der RISC bindet innerhalb des Zytoplasmas an die reife mRNA und zerschneidet diese, wodurch es zur Hemmung der Expression des betreffenden Gens kommt. Durch die Wahl geeigneter, synthetisch hergestellter siRNA Sequenzen (Reynolds et al., 2004) ist es somit möglich spezifisch das zu untersuchende Gen auszuschalten.

Für die Transfektion von AhRR und Sp1 siRNA wurden 2×10^5 HeLa Zellen / Kammer einer 6-Well-Platte eingesetzt. Die Transfektion erfolgte unter Verwendung des Transfektionsreagenzes Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in serumfreien Medium. Das verwendete Verhältnis Lipofectamie/siRNA betrug 2:1. Die benötigten Mengen der siRNA und des Lipofectamins wurden jeweils in 100µl serumfreien Medium verdünnt und für 10min bei RT° inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze kombiniert und erneut bei RT° inkubiert. Nach 10min wurde das Transfektionsgemisch unter Schwenken der Kulturplatte auf die Zellen geträufelt (Endvol. 1ml). Vier Stunden nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium durch komplettes Nährmedium ersetzt.

verwendete siRNA-Sequenzen:

AhRR siRNA	sense	5'-GCAACGAUCGUGGACUAUC tt-3'
	antisense	5'-GAUAGUCCACGAUCGUUGC tt-3'

Kontroll siRNA	sense	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU tt-3'
	antisense	5'-ACGUGACACGUUCGGAGAA tt-3'

Sp1 siRNA (sc-29487)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Kontroll siRNA (sc-37007)	Santa Cruz Biotechnology

2.8 Reporter-Gen Analysen

Die Transfektion der Zellen erfolgte wie unter Punkt 2.5.1 beschrieben. Die für die Bestimmung der regulatorischen Aktivitäten verwendeten AhRR Reporter-Plasmide trugen das Gen der *Firefly* Luziferase (aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*). Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde eine Cotransfektion mit 50ng des Kontrollplasmids *pRL-TK* (Promega) durchgeführt, welches das Gen der Luziferase des Seestiefmütterchens (*Renilla reniformis*) enthält. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit dem zu testenden Fremdstoff bzw. Lösungsmittel belastet. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in 400µl Passiv-Lysis-Puffer lysiert und für 1min bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Proteingehalt des Überstandes wurde wie unter Punkt 2.11.2 bestimmt und die Luziferase-Aktivität mit Hilfe des Dual-Glo Luciferase Assay System Kits (Promega) nach Herstellerangaben gemessen (20µl Probe wurden eingesetzt). Die Messung erfolgte in einem Multi-Bioluminat LB 9505C Gerät (Berthold Detection Systems, Oak Ridge, TN, USA). Die Zeit der Lumineszenz-Messung betrug jeweils 30sec, die Verzögerungszeit zwischen der Messung der *Firefly*- und *Renilla*-Aktivitäten wurde auf 4sec eingestellt. Die ermittelten Aktivitäten der *Firefly* Luziferase wurden auf 1µg Protein berechnet und mittels der *Renilla* Luziferase-Aktivitäten normalisiert.

2.9 Bisulfit-Modifikation von DNA

Die Bisulfit-Modifikation ist ein Verfahren um Veränderungen im Methylierungsmuster der DNA zu untersuchen (Frommer et al., 1992). Hierbei wird die DNA mit Natrium-Bisulfit (NaHSO_3) behandelt, wodurch es zu einer Desaminierung nicht-methylierter Cytosine und folglich zu einer Umwandlung in Uracile kommt. Da das NaHCO_3 nicht mit methylierten Cytosinen reagiert, bleiben diese unverändert. Nach der Bisulfit-Modifikation wird die DNA mit Hilfe der PCR amplifiziert. Allerdings ist bei der Wahl der Primer zu beachten, dass die beiden Einzelstränge nicht mehr komplementär zueinander sind. Während der Doppelstrang-Synthese bewirkt das Uracil den Einbau eines Adenins, so dass es zu einem Austausch zwischen einem GC- und einem AT-Basenpaar kommt.

Für die Untersuchungen wurde das EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Orange, CA, USA) verwendet. Das dem Kit zugrunde liegende Verfahren setzt sich aus drei Schritten zusammen: einer initialen Denaturierung der DNA, der eigentlichen CT-Konversion sowie einer säulenbasierten Aufreinigung und Desulfonierung. Die Durchführung erfolge nach Herstellerangaben.

Für die PCR-basierte Amplifikation mit einer *proof-reading* DNA-Polymerase (*Pwo*) wurden 4µl der modifizierten DNA-Proben eingesetzt. Die nachfolgende DNA-Sequenzierung erfolgte im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Düsseldorf.

Primer zur Amplifikation von Bisulfit-modifizierter DNA:

(synthetisiert von TIB MOLBIOL, Berlin)

AhRR-Bis	FP 5'-GTTTGGAGGTGGTAGGTTGTTTAG-3'
(+39.328 bis +39.599)	RP 5'-CCCACCTCCTACTCCTCCT-3'
Produktlänge: 271bp	Annealing-Temperatur: 50°C

2.10 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunpräzipitation ist eine moderne Methode, die es ermöglicht die Bindung von Proteinen an der DNA *in vivo* nachzuweisen (Orlando, 2000; Das et al., 2004). Hierzu macht man sich die Eigenschaften des Formaldehyds (FA) zu Nutze, das kovalente Bindungen zwischen Proteinen und DNA-Molekülen (sowie zwischen Proteinen untereinander) schließt und diese somit vernetzt. Eine primäre Aminogruppe eines Proteins (z.B. Seitenkette eines Lysins) oder der DNA (z.B. Adenin, Cytosin) reagiert mit dem Formaldehyd unter Bildung einer Schiffschens-Base. Unter Abspaltung eines Wassermoleküls reagiert diese mit einer zweiten primären Aminogruppe und bildet hierdurch eine -CH₂-Brücke zwischen den Reaktionspartnern aus (Melcher, 2004). Fragmentiert man das proteingebundene Chromatin, so kann man mit geeigneten AK das Protein seiner Wahl mit daran gebundener DNA präzipitieren. Durch Aufbruch der FA-vermittelten Bindung und nachfolgender Aufreinigung lässt sich die so gewonnene DNA mit Hilfe der PCR amplifizieren bzw. quantifizieren.

Die ChIP-Assays wurden ähnlich wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (Gerrish et al., 2001; Wang & Hankinson, 2002). Für die ChIP-Analysen wurden ca. 90% konfluent bewachsene Kulturflaschen (T-160) verwendet. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen. Durch eine zehnminütige Behandlung mit 1% (v/v) FA erfolgte die Quervernetzung von DNA und DNA-bindenden Proteinen. Durch Zugabe von Glycin (Endkonzentration 125mM) wurde die Quervernetzung unterbrochen. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 5ml PBS (incl. Protease Inhibitoren) mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturflasche abgelöst. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 4°C und 600 xg wurden die Zellen in 1ml SDS Lysis Puffer resuspendiert. Die Lyse erfolgte für 30min im Eisbad. Die Chromatin-Lysate wurden nun mit einem Sonifier 250 Ultraschall-Stab (Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA) im EtOH-Eisbad geschert: Stufe 5 (125W), 3-4 Intervalle a 10sec mit zweiminütigen Pause dazwischen. Zur Kontrolle des Chromatin-Größenbereichs wurden 15µl des Lysats auf einem Agarosegel (1%) elektrophoretisch aufgetrennt. Gewünscht war ein Größenbereich zwischen 100bp und 1,5kb. Die gescherten Lysate wurden 20min bei ca. 15.000 xg und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde in 100µl Proben aliquotiert. 50µl wurden als Input-Probe entnommen. Zu einem 100µl Aliquot Chromatin wurden 9 Vol. Verdünnungspuffer sowie 35-45µl geblockte Protein G Agarose Beads (Biomol, Hamburg; geblockt mit 5% (w/v) BSA und 100µg/ml Lachs

Spermien DNA) gegeben. Die Proben wurden für 2h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert und anschließend pelletiert. Der Überstand wurde in neue 1.5ml Reaktionsgefäße überführt. Nun wurde der Antikörper zugegeben (Menge variiert je nach Antikörper) und ü.N. auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe der zweiten Charge Protein A Agarose Beads (35µl) wurden die Proben erneut für 2h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Beads wurden pelletiert und je einmal mit 1ml Niedrigsalz-Puffer, 1ml Hochsalz-Puffer und 1ml LiCl-Puffer gewaschen. Zum Abschluss wurden die Beads zweimal mit 1ml TE_{10/1}-Puffer (pH 8) gewaschen. Die Immunkomplexe wurden dann mit 200µl frischem Elutionspuffer auf einem Schüttler bei RT° eluiert (ca. 30min). Nach Zentrifugation wurden dem Eluat 8µl 5M NaCl, 8µl Tris/HCl, pH 7, 4µl 0,5M EDTA sowie 10µl Proteinase K (19,2mg/ml; Roche) zugegeben. Der Ansatz wurde zunächst für 2h bei 55°C, anschließend ü.N. bei 65°C inkubiert. Die DNA wurde mit Hilfe einer Phenol/Chloroform-Extraktion (Abschnitt 2.2.4) und anschließender EtOH-Fällung zurückgewonnen. Die DNA wurde in 25µl DEPC-Wasser rückgelöst. Aliquots der ChIP-Proben wurden 1:5 und 1:10 in DEPC-Wasser verdünnt. Für die ChIP PCR wurden je 5µl der unverdünnten sowie der verdünnten Proben eingesetzt. Die Amplifikation der CYP1A1 und AhRR Genfragmente erfolgte in Gegenwart von 7,5% (v/v) DMSO in einem Standard-Reaktionsansatz (Abschnitt 2.3.2). Die PCR-Produkte wurden anschließend auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch EtBr-Färbung am Fluor-S-MAX (BioRad) visualisiert.

ChIP-Puffer:

Mit Ausnahme des Elutionspuffers enthielten alle verwendeten Puffer den Protease Inhibitor Cocktail III (Calbiochem) in einer Verdünnung von 1:500 sowie den Protease Inhibitor PMSF in einer Endkonzentration von 1mM.

SDS Lysepuffer	1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris, pH 8,1
Verdünnungspuffer	0,01% SDS, 1,1% Triton X-100, 1,2mM EDTA, 167mM NaCl, 16,7mM Tris, pH 8,1
Niedrigsalzpuffer	0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris, pH 8,1

Hochsalzpuffer	0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 0,5M NaCl, 20mM Tris, pH 8,1,
LiCl-Puffer	0,25M LiCl, 1% NP-40, 1% NaDOC, 1mM EDTA, 10mM Tris, pH 8,1
TE _{10/1} -Puffer	10mM Tris, pH 8,1, 1mM EDTA
Elutionspuffer	1% SDS, 0,1M NaHCO ₃

(%-Angaben für SDS & NaDOC = (w/v), für Triton X 100 & NP-40 = (v/V))

Für ChIP-Analysen verwendete Antikörper:

anti-AhRR Serum	polyklonaler AK, Kaninchen, generiert gegen die C-terminale Peptidsequenz: CQFQGKLLKFLFGQKKK	
anti-AhR, Maus		Biomol
anti-ARNT, Maus		Biomol
anit-HDAC-1		Cell Signaling Technology ¹
anit-HDAC-3		Cell Signaling Technology
anit-HDAC-4		Cell Signaling Technology
anit-HDAC-5		Cell Signaling Technology
anit-HDAC-6		Cell Signaling Technology
anit-HDAC-7		Cell Signaling Technology
Kaninchen IgG		Calbiochem

¹ Danvers, MA, USA

Für die Analyse der ChIP-Assays verwendete Oligonukleotide:

AhRR (+17.388 bis +17.711) Produktlänge: 324bp	FP 5'-AACCGGATGGCGTCTCCGGTTC-3' RP 5'-GAGCGCATCCCGTCTCCACC-3' Annealing-Temperatur: 64°C, +7,5% (v/v) DMSO
CYP1A1 (Hestermann & Brown, 2003) Produktlänge: 373bp	FP 5'-CACCCGCCACCCTTCGACAGTTCT-3' RP 5'-CTCCCGGGGTGGCTAGTGCTTTGA-3' Annealing-Temperatur: 58°C, +7,5% (v/v) DMSO

2.11 Co-Immunpräzipitation von HDAC-1 und AhRR

2.11.1 Gewinnung von Kernproteinen

Zur Gewinnung von Kernproteinen wurden die Zellen durch Zugabe von 2ml Accutase von der Kulturflasche abgelöst und mit PBS gewaschen. Das Lysat wurde anschließend durchmischt und für 10min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden für 20min bei 2500x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 300µl Hochsalzpuffer resuspendiert. Die Kernlysate wurden für 3h bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert, kurz mit einem Branson Sonifier (Stufe 4) beschallt und bei 4°C und maximaler Drehzahl für 5min abzentrifugiert.

verwendete Puffer:

Lysepuffer	10mM Tris/HCl, pH 7,2, 10mM NaCl, 1,5mM MgAc, 0,5% (v/v) NP-40, 0,5mM PMSF, Protease Inhibitor Cocktail III
Hochsalzpuffer	20mM Hepes/KOH, pH 7,9, 20mM NaF, 1mM Na ₃ VO ₄ , 1mM Na ₄ P ₂ O ₇ , 125nM Okadasäure, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 420mM NaCl, 20% (v/v) Glycerin, 0,5mM PMSF, Protease Inhibitor Cocktail III

2.11.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentrationen wurden bei einer Wellenlänge von 595nm an einem Zweistrahl-Photometer (Beckmann, München) nach der Bradford-Methode bestimmt (Bradford, 1976). Hierzu wurde der BioRad Protein Assay (BioRad) nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.11.3 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden 500µg Kernprotein eingesetzt. Um optimale Bindungseigenschaften für den Antikörper zu schaffen wurden die Kernproteine mit 9 Vol. Verdünnungspuffer (siehe ChIP-Protokoll) versetzt. Anschließend wurde der Antikörper in einem Verhältnis von 1:100 zu der Probe gegeben. Der Ansatz wurde ü.N. bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Die gebildeten Antikörper/Protein-Komplexe wurden durch Zugabe von 30µl Protein G Agarose Beads (Biomol) und dreistündiger Inkubation bei 4°C auf dem Drehrad präzipitiert. Die Beads-gebundenen Proteine wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in 30µl 4x SDS-Probenpuffer (0,25M Tris, pH6,8, 6% (w/v) SDS , 40% Glycerin (v/v) 0,04% (w/v) Bromphenolblau, 20% (v/v) β-Mercaptoethanol) aufgenommen und für 5min bei 95°C erhitzt. Die Beads wurden abzentrifugiert, der gewonnene Überstand für den Western Blot eingesetzt.

2.11.4 Western Blot Analyse

Die aus der Immunpräzipitation gewonnenen Proteine wurden zunächst mittels SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt . Hierzu wurden die Proteine mit Hilfe einer Hamilton Spritze in die Probenaschen überführt und zunächst in einem 5%igen Acrylamidgel gesammelt. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben in einem 10%igen SDS-Acrylamid-Trenngel. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 150 V für 1h bis 1,5h in 1x Glycinlaufpuffer.

Die aufgetrennten Proteine wurden mittels einer Elektrobplotapparatur (Trans-Blot,SD, BioRad) aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham, Little Chalfont, UK) übertragen. Zuvor wurde das Gel und 12 Lagen Whatmann-Papier für ca.

10min in Transferpuffer äquilibriert. Die Membran wurden für 10sec in Methanol aktiviert und anschließend ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Der Aufbau des Blots sah wie folgt aus: 6 Lagen Whatmann-Papier, Membran, Gel, 6 Lagen Whatmann-Papier. Der Transfer erfolgte für 1h bei einer angelegten Spannung von 20V. Die Membran wurde anschließend für 1h bei 4°C in 5%-Magermilch in TBST geblockt. Anschließend wurde der 1. Antikörper (anti-AhRR, 1:100), verdünnt in 5%-Magermilch in TBST, zugegeben und ü.N. bei 4°C auf einem Schwenker inkubiert. Die Membran wurde zweimal für 20min mit TBST gewaschen. Danach wurde die Membran 1h in Gegenwart des 2. Antikörpers (anti-Kaninchen-IgG, HRP-gekoppelt, 1:5000 5% Magermilch/TBST) bei RT° inkubiert und anschließend erneut zweimal für 20min mit TBST gewaschen. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgte mittels einer Peroxidase-vermittelten Chemilumineszenz-Reaktion. Hierzu wurde die Membran mit 1ml ECL-Reagenz (ECL-Detection-System, Amershem) überschichtet und für 5min inkubiert. Die entstandene Chemilumineszenz wurde auf einem Röntgenfilm (Kodak) detektiert.

verwendete Lösungen:

Polyacrylamid-Sammelgel (5%)	0,5ml Acrylamid 40% (w/v), 2,9ml H ₂ O, 0,5ml Tris/HCl, pH 6,8, 20µl SDS 20% (w/v), 20µl APS, 4µl TEMED
Polyacrylamid-Trenngel (10%)	5ml Acrylamid (40%), 9,4ml H ₂ O, 5,2ml Tris/HCl, pH 8,8, 0,1ml SDS 20% (w/v), 0,1ml APS, 8µl TEMED
1x Glycinlaufpuffer	50mM Tris, 384mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
Transferpuffer	25mM Tris, 20mM Glycin, 20% (v/v) Methanol
TBST	10mM Tris/HCl, pH 7,2, 0,1% (v/v) Tween 20, 150mM NaCl

2.12 Computer-Programme zur Sequenz- und Datenanalyse

Zur Bearbeitung, Analyse und Formatierung der verwendeten Nukleinsäuresequenzen wurden folgende Programme verwendet:

- das Internet-Tool BLAST sowie die Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- ein GCG-basierendes Software-Paket, erreichbar über das HUSAR Bioinformatics Lab (<http://genome.dkfz-heidelberg.de/>)
- die Datenbanken TESS (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>) und Tfsitescan (<http://www.ifti.org/cgi-bin/ifti/Tfsitescan.pl>) zur Analyse putativer Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren
- die Datenbank MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) zur Berechnung putativer methylierter CpG-Inseln.

Die verwendeten DNA-Sequenzen des humanen AhRR sind unter folgenden Genbank Accession-Nummern wieder zu finden: NT_006576.15, AH010004 und NM_020731. In dieser Arbeit wird die erste Base des AhRR Exon 1 als +1 angesehen.

2.13 Statistik

Die gezeigten Mittelwerte \pm Standardabweichung stammen aus mindestens drei Einzelergebnissen. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem *Student's t-Test* (Excel, Microsoft) überprüft. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5% ($p \leq 0,05$) wurde als signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von AhRR und CYP1A1 in den verwendeten humanen Zelllinien

Die in dieser Arbeit behandelten Fragestellungen wurden in vier humanen Zelllinien untersucht: den transformierten Linien A549, HeLa und HepG2 sowie einer primärer Fibroblasten Kultur. Zunächst wurden die verschiedenen Zelllinien hinsichtlich ihrer konstitutiven und durch AhR-Agonisten induzierbaren Expression von AhRR und CYP1A1 charakterisiert. Die Transkriptmengen der untersuchten Gene wurden mit Hilfe der quantitativen *Real-Time* PCR (qRT-PCR) bestimmt.

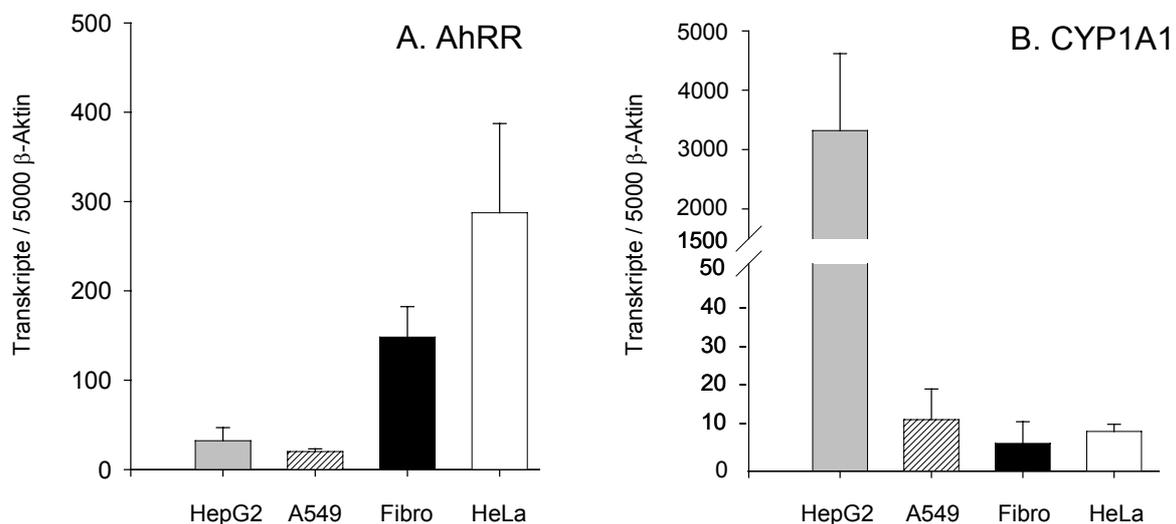


Abb. 5 Konstitutive mRNA Expression von AhRR und CYP1A1.

Mit Hilfe der qRT-PCR wurden die Transkriptionsraten von AhRR (A) und CYP1A1 (B) in den humanen Zelllinien HepG2, A549, primären Fibroblasten (Fibro) und HeLa bestimmt. Dargestellt sind relative Transkriptmengen, normiert auf 5000 Moleküle β -Aktin.

In Abbildung 5A ist die konstitutive AhRR Expression der vier getesteten Zelllinien dargestellt. In A549 und HepG2 Zellen wurde eine basale Transkriptmenge von 30 bis 40 Molekülen pro 5000 Moleküle β -Aktin gemessen. In den primären Fibroblasten war der AhRR etwa fünfmal, in den HeLa Zellen etwa zehnmal höher exprimiert als in den A549 und HepG2 Zellen. Die basale CYP1A1 Expression lag in der Hepatokarzinomzelllinie bei ca.

3000 CYP1A1 Molekülen pro 5000 Molekülen β -Aktin (Abb. 5.B). Dieser Wert war gegenüber den anderen Zelllinien, die ca. 10 CYP1A1 Transkripte pro 5000 β -Aktin Moleküle enthielten, deutlich erhöht.

Die Induzierbarkeit der beiden AhR-Zielgene AhRR und CYP1A1 wurde durch sechsstündige Belastung der zu testenden Zelllinien mit 10 μ M Benzo(*a*)pyrene (B(*a*)P) untersucht. Wie in Abb. 6A zu sehen ist, resultierte eine Belastung mit B(*a*)P nur in den HepG2 Zellen in einer signifikanten, 2,5-fachen Induktion der AhRR Genexpression. In A549, Fibroblasten und HeLa Zellen konnten keine messbaren Veränderungen der AhRR Transkription festgestellt werden. Die sechsstündige Exposition mit B(*a*)P führte in den HepG2 Zellen zu einer vierfachen, in den A549 Zellen zu einer zweifachen CYP1A1 Induktion (Abb. 6B). In den Fibroblasten und HeLa Zellen hatte die Gegenwart des AhR-Agonisten keinen signifikanten Einfluss auf die CYP1A1 Expression.

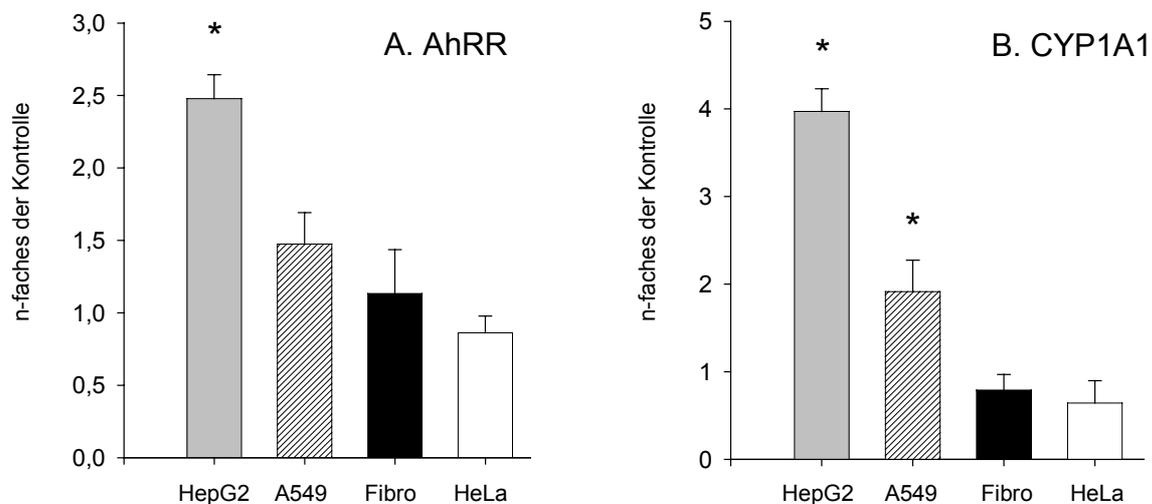


Abb. 6 Induzierbare mRNA Expression von AhRR und CYP1A1.

Mit Hilfe der qRT-PCR wurde die Induzierbarkeit der AhRR (A) und CYP1A1 (B) Genexpression in den humanen Zelllinien HepG2, A549, primären Fibroblasten (Fibro) und HeLa untersucht. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 6h mit 10 μ M B(*a*)P oder Lösungsmittel behandelt. Die mRNA Expression ist relativ zu den Kontroll-Proben dargestellt; *= $p \leq 0,05$.

Auf Grund dieser Daten wurden die vier Zelllinien wie folgt charakterisiert. In den primären Fibroblasten und HeLa Zellen ist der AhRR konstitutiv hoch exprimiert und CYP1A1 ist

nicht induzierbar. Diese Zellen wurden als nicht responsiv eingestuft. Die HepG2 Zellen enthielten relativ geringe basal exprimierte AhRR Transkriptmengen. Auf Grund der Induzierbarkeit von CYP1A1 und AhRR wurden diese Zellen als responsiv klassifiziert. Die A549 Zellen zeigten ebenfalls eine geringe konstitutive AhRR Expression auf. Das CYP1A1 Gen war schwach induzierbar, woraufhin diese Zelllinie als schwach responsiv angesehen wurde. Für die nachstehenden Experimente zur Charakterisierung des humanen AhRR standen folglich vier Zelllinien mit unterschiedlicher enzymatischer Grundausstattungen und Responsivität zur Verfügung.

3.2 Struktur des humanen AhRR Gens

Das humane AhRR Gen ist auf Chromosom 5p15.33 kodiert und erstreckt sich über eine Länge von ca. 130kb. Das Gen besteht aus 12 Exons, wobei das ATG Startcodon in Exon 2 lokalisiert ist (Abb. 7). Die für bHLH-PAS Proteine charakteristischen Domänen sind in Exon 3 (bHLH) sowie Exon 5 und 6 (PAS) kodiert (Cauchi et al., 2003).

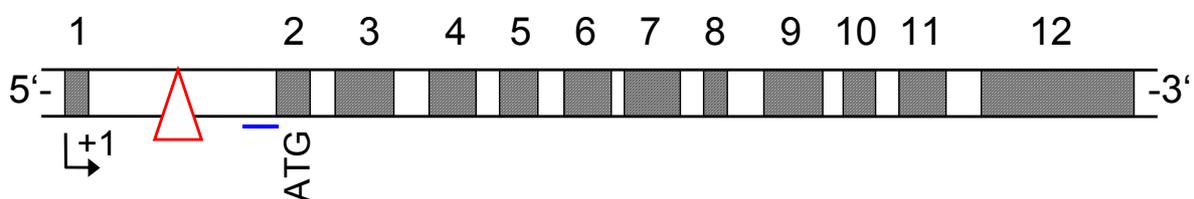


Abb. 7 Schematische Struktur des humanen AhRR Gens.

Die schraffierten Kästen stellen die 12 Exon-Strukturen dar. Der Transkriptionsstart ist mit +1, das Startcodon mit ATG gekennzeichnet. Das rote Dreieck zeigt die Position des in dieser Arbeit klonierten Genabschnitts. Der blaue Balken gibt die Lokalisation eines bereits in der AG Abel vorhandenen klonierten Abschnitts an.

Durch Datenbank-gestützte Analysen konnte eine DNA-Region innerhalb des Intron 1 identifiziert werden, die mehrere putative Bindemotive für Transkriptionsfaktoren enthält (Abb. 8). Der betreffende Sequenzbereich erstreckt sich über 1kb und ist zentral innerhalb des ca. 39,7kb großen Intron 1 gelegen (von +16.873 bis +17.897). In diesem DNA-Fragment wurden vier putative XRE-Motive mit klassischer 5'-GCGTG-3' Kernsequenz an folgenden

Positionen lokalisiert: +16.959 (XRE-1), +17.143 (XRE-2), +17.507 (XRE-3) und +17.678 (XRE-4). Neben den putativen XREs wurden zwei putative GC Boxen (+16.925 und +17.490) sowie eine potentielle Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF-κB (+17.521) identifiziert (Abb. 8). Für die nachfolgende Analyse dieser putativen regulatorischen Elemente wurde der Sequenzabschnitt in ein Luziferase-tragendes Reporter-Plasmid kloniert (*pAhRR*).

```

+16.873      CAGGCAGGACCCTGCTCTCGGCCGCGGGTCCCAGGTTGCCGACCGGCGGGGTGGGCGGGG
                                                    GC Box-1
+16.933      CAGGGGCACCCAGGGCCGCACACCTGCCGCGTGGGACCCTGAAATGCCAGGACGAAGAA
                                                    XRE-1
+16.993      CGTCGCACGGACGACCCTGCCGTGCCTGGCGCGCTCCGCTTCCTGGGAAGCTCAGGATC
+17.053      CAAAAGCATCTTAATATTCTCTATAATTGCGCAAAAACCATGACTCCTTTTACATTTTCG
                                                    XRE-2
+17.113      AAACGACCTCATGGGGCAGGCGAGGGGGCACACGCTCTCCTCACTTTACCTGTTCCGGGTC
+17.173      TACACCGCCCGGCTCTAGGGCCGGCAGCTCAGCACAGCCGGCCGCGAGCGCTGGGGAGGG
+17.233      GACGGGGGCGCAGGGAGAACCAGGGGGACCCTGGGCGCACACAGACCCAGGGGGAACGCA
+17.293      GGGCCTGGAGGGGCTCAGCGCGGACCCCCGCTCGGGGCACGGAGACTCCGGGGGATCA
+17.353      CTGGGACCGGAAGGGCGCAGGGCGGACCCAGGGGAACCGGATGGCGTCTCCGGTTCCGC
+17.413      AGGGCAGCTGGGGCAGCCGGACCCGAGACAGCCGGACCCGCGGGCGCCCTCTGCCGCCTC
                                                    GC Box-2           XRE-3           NF-κB
+17.473      CCGGCCCTGGATGCTGCGGGGCGGGGCGGGCGGCTCGCGTGCCGGGGTGGGGCAGTCCCT
+17.533      GGAGCCGCCCGGGTTCCCGGGATGCGAGCGCCGGCACCCGCCCCACAGCTCCTGGCCA
+17.593      GGGCGCGCTGCCCCGCGGGTGTGCCTGAGCCTCCGCGCCCCGCAGGCCCTGGGTAAGTGT
                                                    XRE-4
+17.653      CCTGGGCGCCCCCGCAGGCCCCCGCCGCGTGCCCGCCGCGGTGGAGACGGGATGCGCTCC
+17.713      CGGGTGTGGGGCTGAGGGACGGGCGCCGGCGTCCGGACCCTCCTCACGCCGCATCCTCGC
+17.773      GTCGCCAGGCCCGGCGGCCCCGGGACGGGGCGGACACTCTGGGGTGGCGCTGGCTGGTCT
+17.833      CACTTAAAACTCGGACCTCGGAGGAAGCCGCGGCGCTCCACGGTTCGTGGTCTCAGC
+17.893      GTCCC      +17.897

```

Abb. 8 Insertion des *pAhRR* Reporter Plasmids.

Das Luziferase Reporter-Plasmid *pAhRR* enthält eine 1025bp lange Sequenz aus dem Intron 1 des humanen AhRR Gens (+16.873 bis +17.897). Die Lokalisation putativer Bindemotive (XREs, GC Boxen, und NF-κB-Motive) für Transkriptionsfaktoren ist eingezeichnet.

Neben diesem regulatorischen Bereich wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Abel zuvor ein ca. 1,8kb langes Fragment des AhRR Intron 1 kloniert (*pAhRR-2*). Dieser Sequenzabschnitt ist unmittelbar vor dem ATG Startcodon lokalisiert (von +37.922 bis +39720) und zeigt regulatorische Aktivitäten auf (Kohli, 2006). Es konnten zwei putative XRE-Motive sowie mehrere putative GC Boxen identifiziert werden. Durch Generierung eines Deletionskonstruktes, das nur eines der beiden XREs enthält (*pAhRR-3*), konnte die Aktivität beider XRE-Elemente belegt werden (Kohli, 2006).

3.3 Identifizierung responsiver XRE-Motive des humanen AhRR Gens

Um zu prüfen, ob der klonierte DNA-Bereich des AhRR Intron 1 (*pAhRR*) regulatorische Aktivitäten aufweist, wurde zunächst ein vergleichendes Experiment mit den bereits charakterisierten *pAhRR-2* und *pAhRR-3* Vektoren durchgeführt. Hierzu wurden HepG2 Zellen mit jeweils 5µg der Plasmide *pAhRR*, *pAhRR-2* und *pAhRR-3* transfiziert. Nach 48-stündiger Belastung der Zellen mit 10µM 3-Methylcholanthren (3-MC) oder Lösemittel wurden die Zellen lysiert und die Luc-Aktivitäten der Proben im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen bestimmt. Wie in Abbildung 9 zu sehen, zeigten alle drei Reporter-Plasmide eine signifikante Erhöhung der Luc-Aktivität in den 3-MC-behandelten HepG2 Zellen auf. In den *pAhRR* transfizierten HepG2 Zellen war ein 3-MC-induzierter Anstieg der Luc-Aktivität um Faktor 4,5, in den *pAhRR-2* enthaltenden Zellen um Faktor 7 zu beobachten. Im Vergleich zu den *pAhRR-2* Transfektionen zeigten die mit dem Deletionskonstrukt *pAhRR-3* transfizierten Zellen eine deutlich geringere Induktion der Reporter-Gen Aktivität (dreifach) auf.

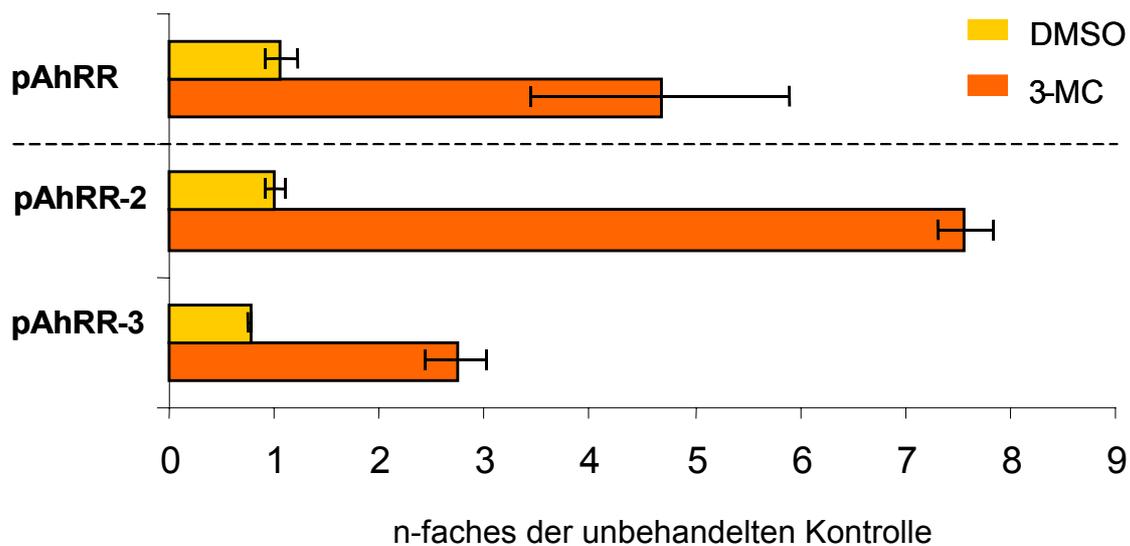


Abb. 9 Reporter-Gen Analysen mit verschiedenen regulatorischen AhRR Konstrukten.

HepG2 Zellen wurden mit 5µg des in dieser Arbeit klonierten *pAhRR* Reporter-Plasmids oder mit den bereits existierenden Vektoren *pAhRR-2* und *pAhRR-3* transfiziert. Die Zellen wurden für 48h mit 10µM 3-MC bzw. Lösemittel behandelt. Die gemessenen *Firefly*-Aktivitäten wurden gegen die *Renilla*-Aktivitäten normiert und sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen dargestellt.

Dieses Experiment zeigte, dass das konstruierte Reporter-Plasmid *pAhRR* regulatorisch aktiv ist. Es gab aber keinen Aufschluss darüber, welche der putativen XRE-Motive responsiv sind. Um dieses zu untersuchen, wurden Deletionskonstrukte des Ausgangsplasmids *pAhRR* erzeugt. Die deletierten Vektoren wurden in HepG2 Zellen transfiziert (je 2µg) und auf ihre Reporter-Gen Aktivitäten in Gegenwart von 3-MC untersucht. In Abbildung 10 sind die Aktivitäten der verschiedenen Luc-Plasmide *pAhRR* und *pAhRR-Δ1* bis *-Δ5* in Relation zu den Aktivitäten der Lösemittel-behandelten Leervektor-Proben (*pGL3-basic*) gezeigt. Im Vergleich zu diesen Kontrollen konnte bereits ein ~100-facher Anstieg der basalen Luc-Aktivität in *pAhRR*-transfizierten Zellen verzeichnet werden. Die Belastung *pAhRR*-transfizierter Zellen mit 10µM 3-MC für 48h führte zu einer 600- bis 700-fachen Induktion der Luc-Aktivität. Die Deletion der putativen XREs 3 und 4 (*pAhRR-Δ1*) führte zu dem Verlust der basalen und der induzierbaren Luc-Aktivität. Im Vergleich zum *pAhRR* Ausgangsplasmid hatte die Deletion von XRE-1 und -2 (*pAhRR-Δ2*) keinen Einfluss auf die Luc-Expression, die gemessenen Aktivitäten waren etwa gleich hoch. Da folglich mindestens eines der beiden XRE-Motive -3 und -4 funktionell ist, wurden weitere Deletionskonstrukte

hergestellt. Die Deletion des XRE-3 (*pAhRR-Δ4*) führte erneut zum Verlust der konstitutiven und induzierbaren Reporter-Gen Aktivität und implizierte somit, dass XRE-3 responsiv ist. Durch die Transfektion von HepG2 Zellen mit dem *pAhRR-Δ5* Konstrukt konnte dieses belegt werden. Sowohl die Höhe der basalen als auch die der 3-MC-induzierte Luc-Aktivität lagen im Bereich des *pAhRR* Vektors.

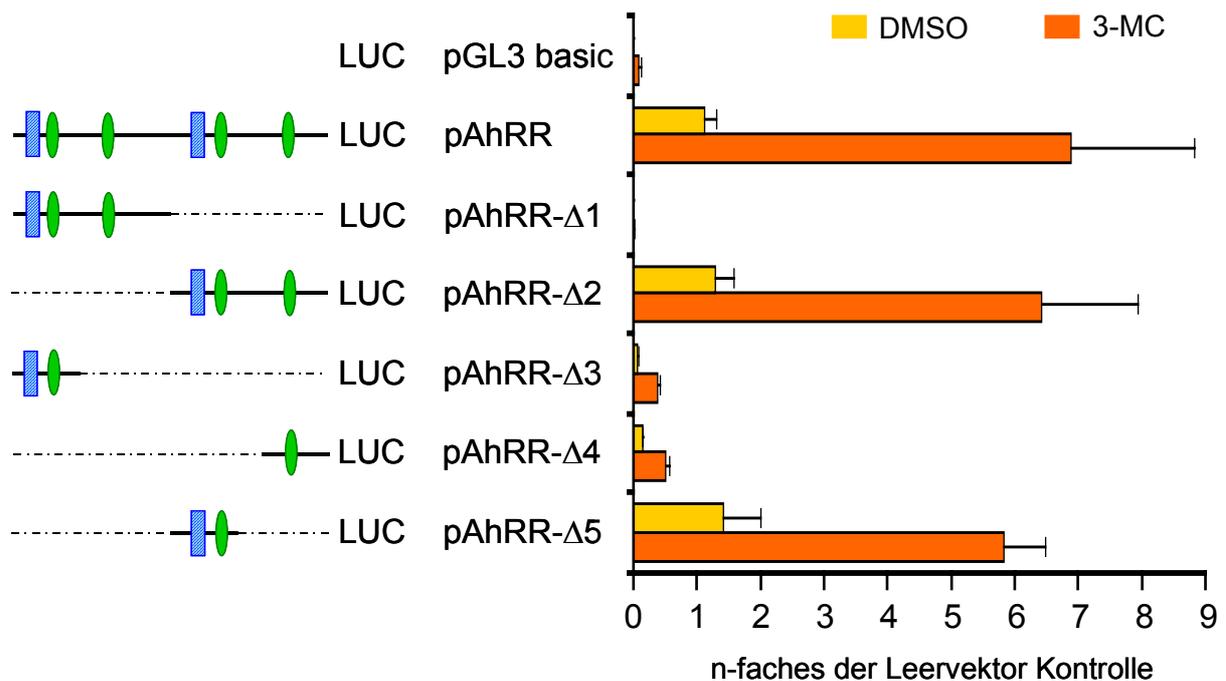


Abb. 10 Reporter-Gen Analysen mit *pAhRR* und daraus generierten Deletionskonstrukten.

HepG2 Zellen wurden jeweils mit 2 μg des *pAhRR* Vektors, der Deletionskonstrukte *pAhRR-Δ1* bis *-Δ5* oder des Leervektors *pGL3-basic* transfiziert und 24h später mit 10 μM 3-MC oder DMSO behandelt. Nach 48h wurden die *Firefly*-Aktivitäten gemessen und gegen die *Renilla*-Aktivitäten abgeglichen. Die relativen Luc-Aktivitäten sind als n-faches der DMSO-behandelten Leervektor Kontrolle dargestellt. Putative XRE sind grün, die putativen GC Boxen blau dargestellt.

Um zu belegen, dass die gemessenen Aktivitäten auf das XRE-3 und nicht auf mögliche andere, AhR-unabhängige Prozesse zurückzuführen sind, wurden *pAhRR-Δ5*-enthaltende HepG2 Zellen mit 3-MC und dem spezifischen AhR-Antagonisten 3'-Methoxy-4'-Nitroflavon (MNF) (Lu et al., 1995) behandelt (Abb. 11). Die Gegenwart des AhR-Antagonisten führte zu einer signifikanten Verminderung der 3-MC-induzierten Luc-Aktivität, die etwa im Größenbereich der Lösemittelkontrolle lag.

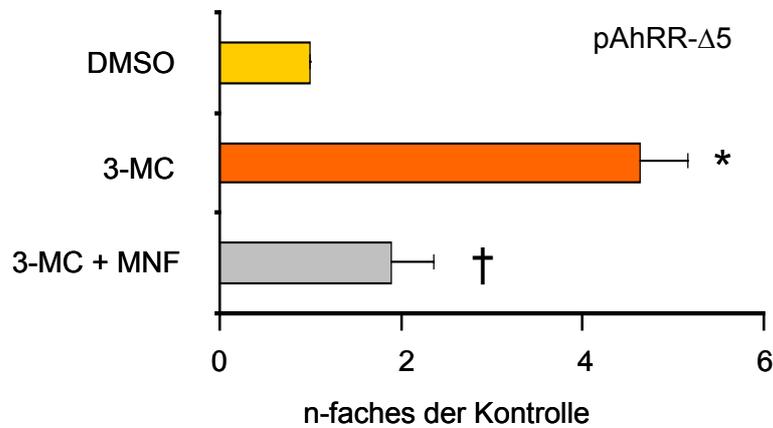


Abb. 11 Einfluss von MNF auf die 3-MC-induzierte Aktivität des *pAhRR-Δ5* Vektors.

HepG2 Zellen wurden mit 2µg *pAhRR-Δ5* transfiziert und anschließend für 48h entweder mit 10µM 3-MC, einer Kombination von je 10µM 3-MC und MNF oder mit DMSO behandelt. Die gemessenen *Firefly*-Aktivitäten wurden gegen die *Renilla*-Aktivitäten normiert und sind hier relativ zur DMSO-Kontrolle dargestellt. * = signifikant unterschiedlich zur DMSO-Kontrolle, † = signifikant reduziert zur 3-MC-behandelten Probe; *, † = $p \leq 0,05$.

Eine weitere geeignete Methode zur Untersuchung der Funktionalität dieses AhR-Bindemotivs ist die Mutation der XRE-3 Kernsequenz (*site-directed mutagenesis*). Dieses Experiment war jedoch, vermutlich auf Grund des hohen GC-Gehalts (74%) des untersuchten Fragments, nicht erfolgreich.

3.4 Regulation des humanen AhRR Gens durch AhR, ARNT und AhRR

Mit Hilfe von Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) Analysen sollte geklärt werden, ob und welche der am AhR-Signalweg beteiligten bHLH-PAS Proteine an der transkriptionellen Kontrolle des humanen AhRR Gens beteiligt sind. Hierzu wurden HepG2 Zellen in Intervallen von 10min über einen Zeitraum von 1h mit 10µM 3-MC belastet. Anschließend wurden die präparierten Chromatin-Proben mit Antikörpern gegen AhR, ARNT und AhRR

präzipitiert und mittels PCR hinsichtlich der Bindung dieser Proteine an das AhRR XRE-3 untersucht.

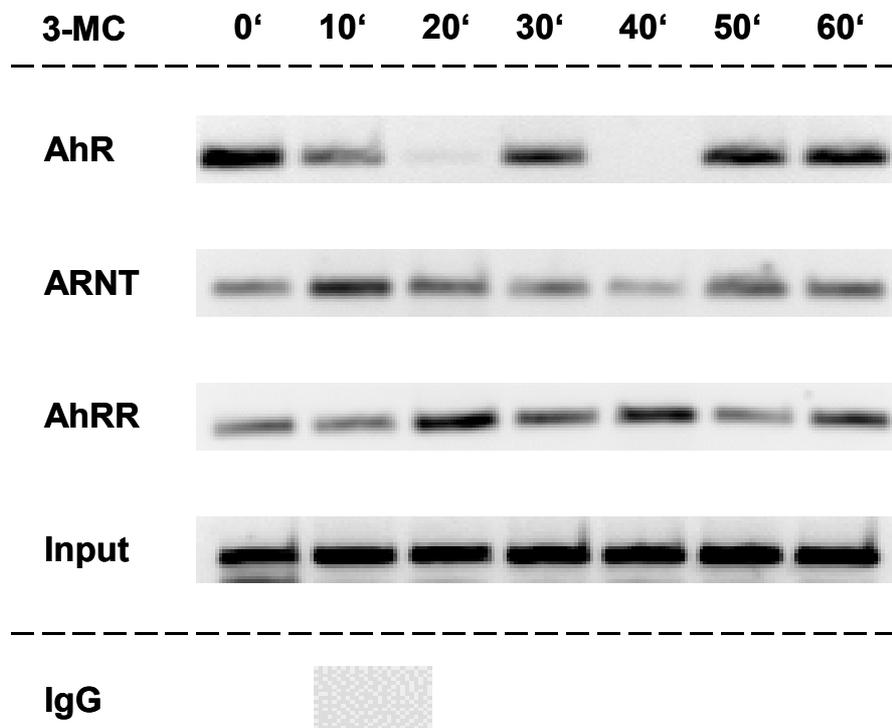


Abb. 12 ChIP-Analyse der AhR-, ARNT- und AhRR-Bindung an das XRE-3 Motiv.

HepG2 Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 10 μ M 3-MC belastet. Anschließend wurden ChIP Analysen mit anti-AhR, anti-ARNT und anti-AhRR Antikörpern durchgeführt. Als Kontrolle wurde einer Probe während der Präzipitation IgG zugesetzt. Aus den erhaltenen DNA-Proben wurde mit Hilfe der PCR die XRE-3-Bindung der getesteten Proteine untersucht.

Wie in Abbildung 12 gezeigt, konnte bereits in unbehandelten HepG2 Zellen eine Bindung von AhR, ARNT und AhRR an das XRE-3 beobachtet werden. Die Behandlung der Zellen mit 3-MC führte zu einem oszillierenden Bindungsmuster von AhR, ARNT und AhRR. Nach 20min und 40min wurde eine starke XRE-Bindung des AhRR Proteins beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt konnte keine bzw. eine sehr geringe Bindung des AhR an das XRE-3 notiert werden. Zu späteren Zeitpunkten (50min und 60min) nahm die Intensität der Banden in den AhR-präzipitierten Proben stark zu. Zeitgleich nahm die Intensität der AhRR/XRE-3 Bindung

ab. Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass neben AhR und ARNT auch der AhRR an seiner eigenen Genregulation partizipiert. Diese Befunde deuten auf eine Autoregulation des AhRR hin.

3.5 Regulation des humanen AhRR Gens durch GC Box-bindende Transkriptionsfaktoren

Neben den vier putativen XREs wurden zwei potentielle GC Boxen innerhalb der regulatorischen AhRR Intron 1 Sequenz identifiziert (Abb. 8). Die putative GC Box-1 (+16.925) ist in den Insertionen der Deletionskonstrukte *pAhRR-Δ1* und *pAhRR-Δ3* enthalten. Diese Konstrukte zeigten keine erhöhten Grundaktivitäten auf. Daher wurde dieses putative Element nicht weiter untersucht.

Die GC Box-2 (+17.490) ist unmittelbar 5'-aufwärts des responsiven XRE-3 gelegen. In den Reporter-Gen Analysen wiesen die Plasmide *pAhRR*, *pAhRR-Δ2* und *pAhRR-Δ5* eine etwa 100-fach höhere basale Aktivität auf als der Leervektor *pGL3-basic* (Abb. 10). Diese erhöhten Aktivitäten deuten möglicherweise auf eine Regulation der AhRR Genexpression durch GC Box-bindende Transkriptionsfaktoren hin. Um dieses zu prüfen, wurden HepG2 Zellen mit 2µg des *pAhRR-Δ5* Plasmids transfiziert und mit 150nM Mithramycin A (MitA) belastet. MitA ist eine als Chemotherapeutikum eingesetzte Chemikalie, die an GC-reiche DNA-Sequenzen bindet und somit die Aktivitäten von Zink-Finger-enthaltenden Transkriptionsfaktoren der Sp1-Familie unterdrückt (Blume et al., 1991; Nehls et al., 1993). Eine 24-stündige Behandlung der transfizierten Zellen mit MitA resultierte in einer signifikanten Reduktion der basalen Luc-Aktivität (Abb. 13). Durch eine kombinierte Belastung der HepG2 Zellen mit 3-MC und MitA sollte die Frage geklärt werden, ob MitA auch die induzierbare Luc-Aktivität des *pAhRR-Δ5* Plasmids beeinflussen kann. Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, kam es in Gegenwart von MitA zu einer signifikanten Hemmung der 3-MC-induzierten Reporter-Gen Aktivität. Dieser Befund spricht für einen kooperativen Mechanismus der AhRR Genregulation von GC Box und XRE-3.

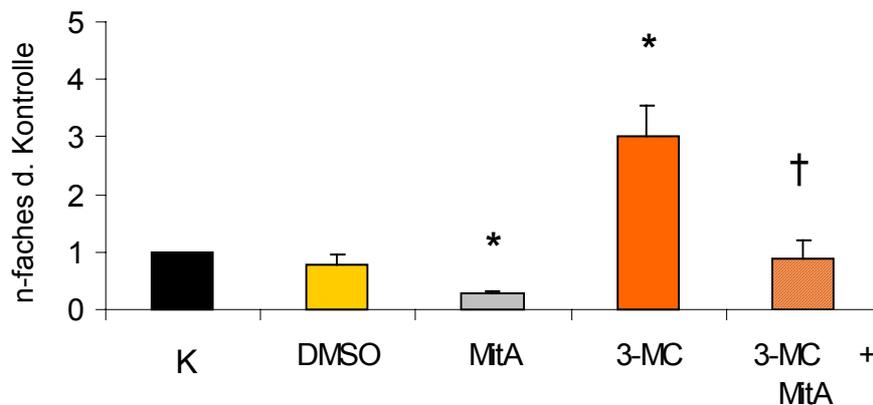


Abb. 13 Einfluss von MitA auf die basale und die 3-MC-induzierte Aktivität des pAhRR- Δ 5 Plasmids.

HepG2 Zellen wurden mit $2\mu\text{g}$ pAhRR- Δ 5 transfiziert und anschließend für 48h mit $10\mu\text{M}$ 3-MC, 150nM MitA oder einer Kombination von $10\mu\text{M}$ 3-MC und 150nM MitA behandelt. Die gemessenen *Firefly*-Aktivitäten wurden gegen die *Renilla*-Aktivitäten normiert und sind hier relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. * = signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle, † = signifikant reduziert zur 3-MC-behandelten Probe; *, † = $p \leq 0,05$.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden RT-PCR-Experimente mit HeLa Zellen durchgeführt. Wie unter Punkt 3.1 bereits beschrieben, weisen diese Zellen eine hohe konstitutive AhRR mRNA Expression auf. Nach der Belastung der HeLa Zellen mit 150nM MitA für 1,5h, 3h, 4,5h, 6h und 12h wurde die Expression von AhRR, CYP1A1 und c-myc gemessen. Das c-myc Gen stellt eine positive Kontrolle für diesen Versuch dar. In der Literatur ist beschrieben, dass die konstitutive Expression von c-myc Sp1-abhängig reguliert wird und durch MitA inhibierbar ist (Snyder et al., 1991). Wie in Abbildung 14A zu sehen ist, führte die Belastung mit MitA bereits nach 3h zu einer 50%igen Reduktion des AhRR mRNA Gehalts. Nach 12h Belastung betrug die relative AhRR Kopienzahl etwa 25% des Kontrollwertes. Die konstitutive Expression des Sp1-regulierten c-myc Gens wurde zeitlich parallel zu der Expression des AhRR herabreguliert (Abb. 14B). Die Messung der CYP1A1 Expression zeigte, dass diese mit abnehmender AhRR Expression anstieg (Abb. 14C). Nach 12h war die Kopienzahl im Vergleich zur Kontrolle etwa vier- bis fünffach erhöht.

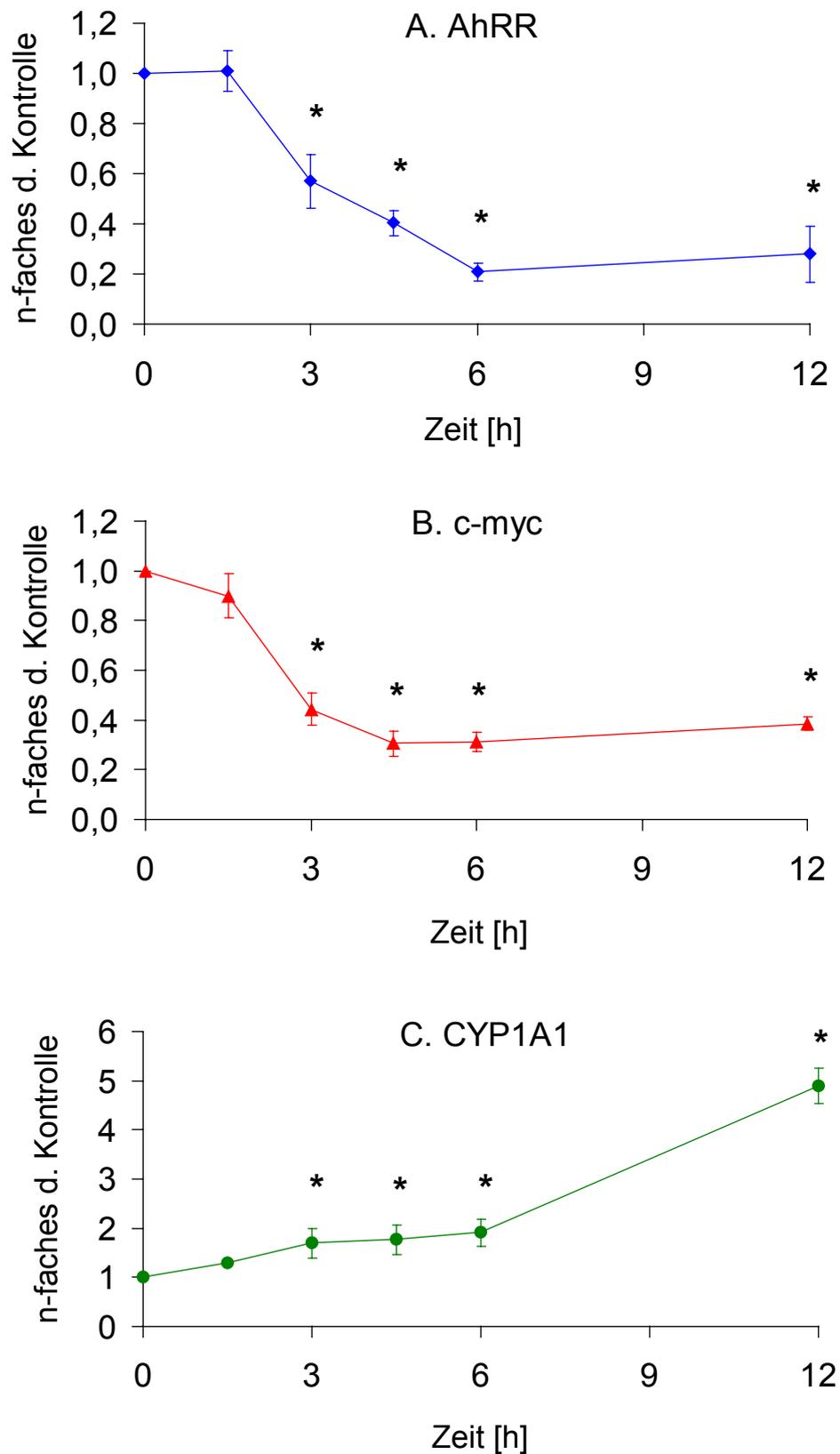


Abb. 14 Einfluss von MitA auf die konstitutive Genexpression in HeLa Zellen.

HeLa Zellen wurden für 1,5h, 3h, 4,5h, 6h und 12h mit 150nM MitA belastet. Durch qRT-PCR-Analysen wurde die mRNA Expression von AhRR (A), c-myc (B) und CYP1A1 (C) bestimmt; * = $p \leq 0,05$.

Wie bereits erwähnt (Abschnitt 3.1), ist das CYP1A1 Gen in HeLa Zellen nicht responsiv gegenüber AhR-Agonisten wie 3-MC. Daher stellte sich die Frage, ob eine Belastung mit MitA die CYP1A1-Responsivität in diesen Zellen wiederherstellt. Hierzu wurden HeLa Zellen mit 3-MC alleine und in Kombination mit MitA behandelt. Entsprechend der vorangegangenen Daten hatte 3-MC keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von AhRR und CYP1A1 (Abb. 15). Die kombinierte Belastung mit 3-MC und MitA führte zu einer deutlichen Reduktion des AhRR mRNA Spiegels auf ca. 20%. Im Gegenzug kam es zu einem siebenfachen Anstieg der CYP1A1 Transkriptionsrate (Abb. 15).

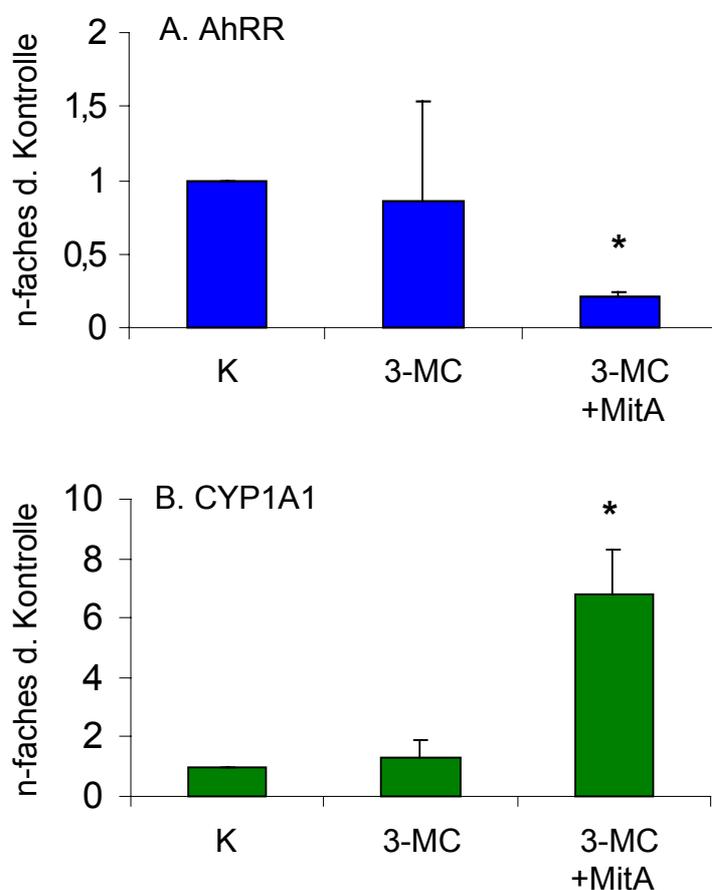


Abb. 15 Einfluss von 3-MC und MitA auf die Genexpression von AhRR und CYP1A1 in HeLa Zellen.

HeLa Zellen wurden für 12h mit 10 μ M 3-MC oder einer Kombination von 10 μ M 3-MC und 150nM MitA belastet. Anschließend wurde mittels qRT-PCR die mRNA Expression von AhRR (A) und CYP1A1 (B) untersucht; * = $p \leq 0,05$.

Mit Hilfe der siRNA-Technik wurde untersucht, ob ein Ausschalten des Transkriptionsfaktors Sp1 einen Einfluss auf die konstitutive Expression des AhRR Gens hat. Dazu wurden HeLa Zellen mit 100nM Sp1 siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und die Expressionsraten von Sp1 und AhRR nach 24h und 48h mittels qRT-PCR bestimmt. Wie in Abbildung 16 dargestellt ist, konnte die mRNA Expressionsrate von Sp1 nur auf ca. 65% (24h) bzw. ca. 55% (48h) im Vergleich zu den *non-silencing*-Kontrollen reduziert werden. Die AhRR

mRNA Expression wurde durch diese Modulation der zellulären Sp1 mRNA Menge nicht signifikant beeinflusst (Abb. 16B). Dieses Ergebnis kann entweder bedeuten, dass Sp1 nicht das dominante GC Box-bindende Protein im verwendeten Zellsystem ist oder, dass die erreichte Reduktion des Sp1 mRNA Gehaltes um 40% bis 50% zu gering war, um Auswirkungen auf zelluläre Signalwege zu haben.

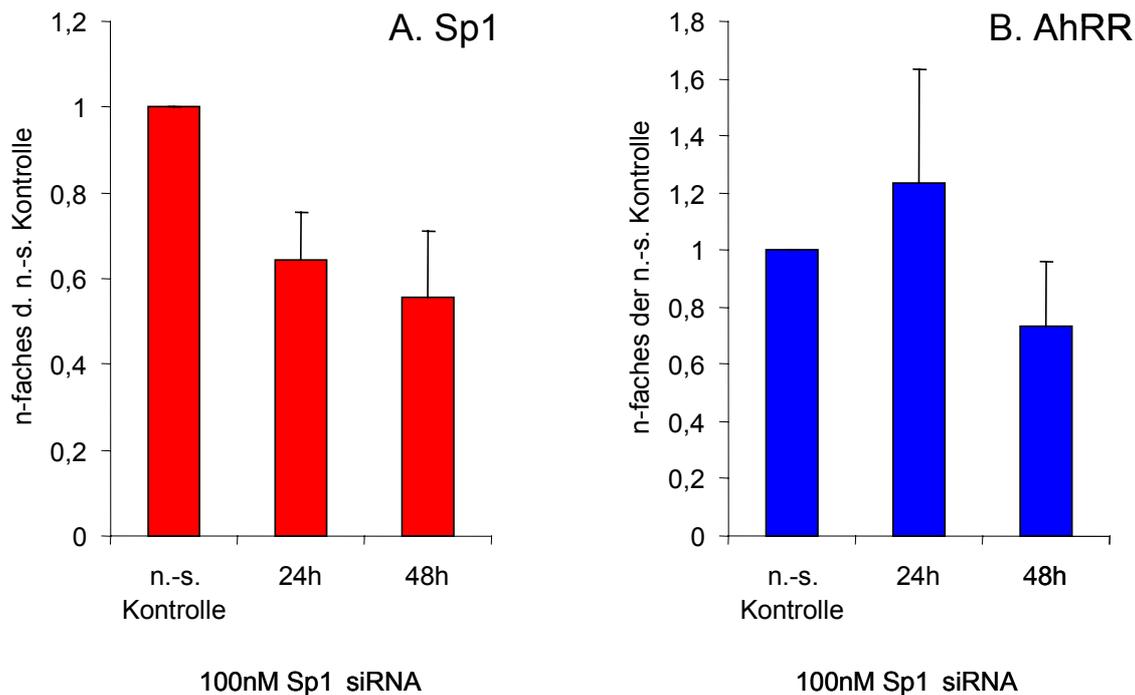


Abb. 16 Genexpression von Sp1 und AhRR nach transienter Transfektion mit Sp1 siRNA in HeLa Zellen. HeLa Zellen wurden mit 100nM Sp1 siRNA oder 100nM *non-silencing* Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 24h und 48h erfolgte die Analyse der Sp1 (A) und AhRR (B) mRNA Expression mittels qRT-PCR.

Zusammengefasst lässt sich aus den Reporter-Gen und qRT-PCR-Versuchen ableiten, dass die Transkription des humanen AhRR Gens durch ein Zusammenspiel von XRE- und GC Box- abhängigen Transkriptionsfaktoren reguliert wird.

3.6 Einfluss von Hypoxie-simulierenden Agenzien auf die AhRR Transkription in HepG2 Zellen

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Expression von AhR-Zielgenen (z.B. CYP1A1) unter hypoxischen Bedingungen inhibiert wird (Gassmann et al., 1997). Daraufhin sollte untersucht werden, ob eine Aktivierung der Hypoxie-sensitiven Signalwege Einfluss auf die Expression des AhRR, als ein weiteres AhR-Zielgen, hat.

Um dieses zu untersuchen, wurden HepG2 Zellen mit 300µM Desferrioxamin (DFX), einem chemischen Induktor des hypoxischen Signalwegs (Wang & Semenza, 1993), belastet. Nach 1h, 3h, 6h, 12h, 18h und 24h wurde die mRNA der Zellen isoliert und qRT-PCR Analysen unterzogen. Um die Aktivierung der hypoxischen Signalkaskade zu kontrollieren, wurde neben AhRR und CYP1A1 auch die Expression des HIF-1α-Zielgens VEGF (*vascular endothelial growth factor*) analysiert.

Wie in Abbildung 17C zu sehen ist, stieg die Expression des Hypoxie-Markergens VEGF nach einer Behandlungszeit von 3h leicht an. Nach 6h war die VEGF mRNA im Vergleich zur Kontrolle um das dreifache erhöht und blieb auch zu späteren Messpunkten auf diesem Niveau. In zeitlicher Übereinstimmung mit dem Hypoxie-induzierten VEGF mRNA-Anstieg, begann die Transkriptionsrate des CYP1A1 Gens zu sinken. Nach 24h betrug die CYP1A1 Expression in den DFX-behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollproben etwa 10% (Abb. 17B). Die mRNA Expression des AhRR verhielt sich im Laufe der DFX-Behandlung biphasisch. Nach 6h war die AhRR Transkription auf ca. 45% des Kontrollwertes herabreguliert (Abb. 17A). Zu späteren Zeitpunkten stieg die AhRR Expression an. Nach 24h war diese um das dreifache erhöht. Dieses Ergebnis deutet auf eine Hypoxie-vermittelte transkriptionelle Regulation des humanen AhRR Gens hin.

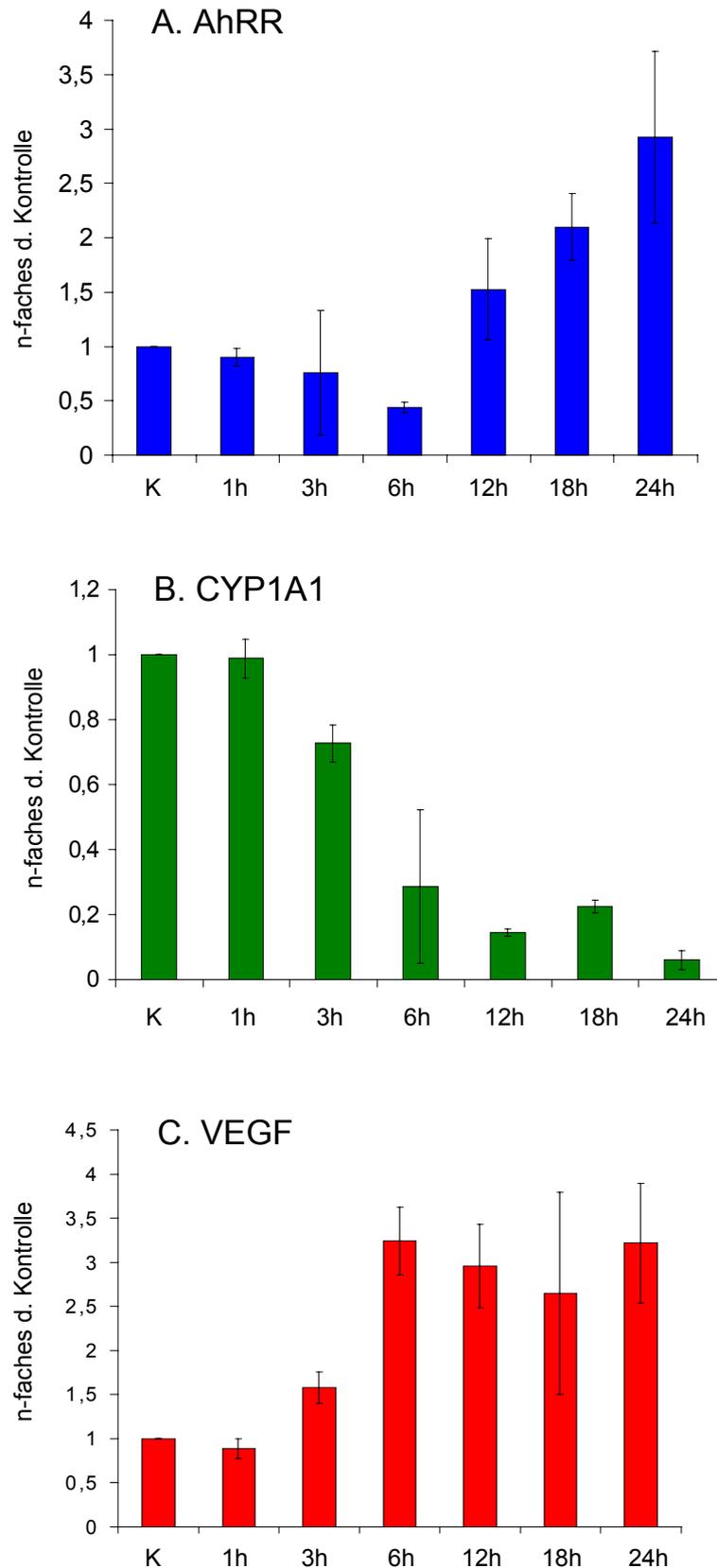


Abb. 17 Wirkung von DFX auf die konstitutive Genexpression in HepG2 Zellen.

HepG2 Zellen wurden für 1h, 3h, 6h, 12h, 18h und 24h mit 300 μ M DFX behandelt. Im Anschluss erfolgte die Analyse der AhRR (A), CYP1A1 (B) und VEGF (C) Transkriptionsraten mittels qRT-PCR; * = $p \leq 0,05$.

Um den zugrunde liegenden Mechanismus genauer zu analysieren, wurde der Einfluss von DFX auf die Luc-Aktivitäten des Reporter-Gen Plasmids *pAhRR* untersucht. Wie in Abbildung 18 gezeigt, bewirkte eine 48-stündige Behandlung von *pAhRR*-transfizierten HepG2 Zellen mit 300 μ M DFX eine fünffache Erhöhung der Luc-Aktivität. Diese DFX-induzierte Steigerung der Luc-Aktivität konnte auch in *pAhRR- Δ 5*-enthaltenden HepG2 Zellen beobachtet werden. Diese Ergebnisse implizieren, dass ein in *pAhRR- Δ 5*-enthaltenes regulatorisches Sequenzmotiv für die DFX-aktivierte Transkription des AhRR Gens verantwortlich ist. In dem klonierten regulatorischen Bereich des AhRR Intron 1 konnten keine putativen HRE-Motive identifiziert werden. Allerdings wurde eine putative Bindungsstelle für NF- κ B, einen Redox-sensitiven Transkriptionsfaktor, gefunden (Abb. 8).

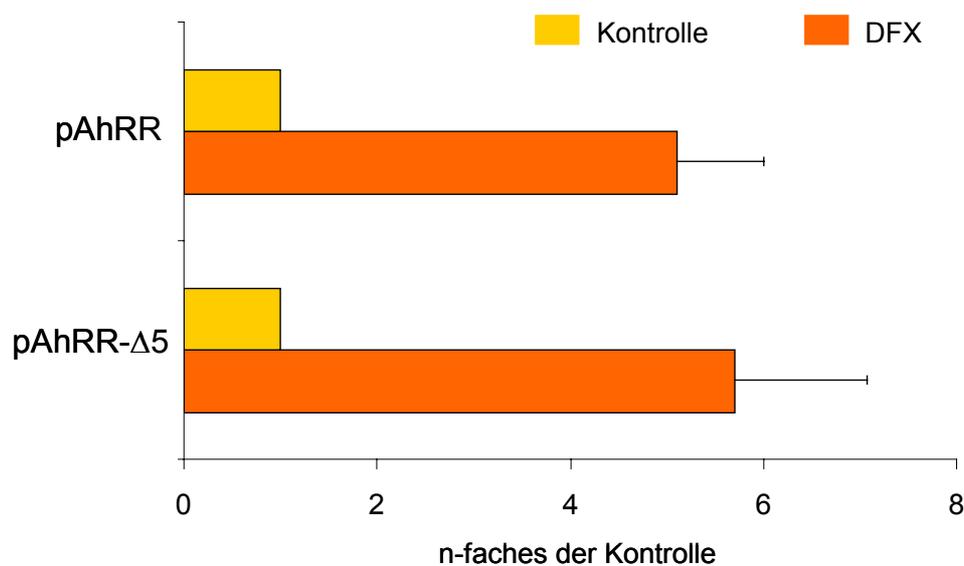
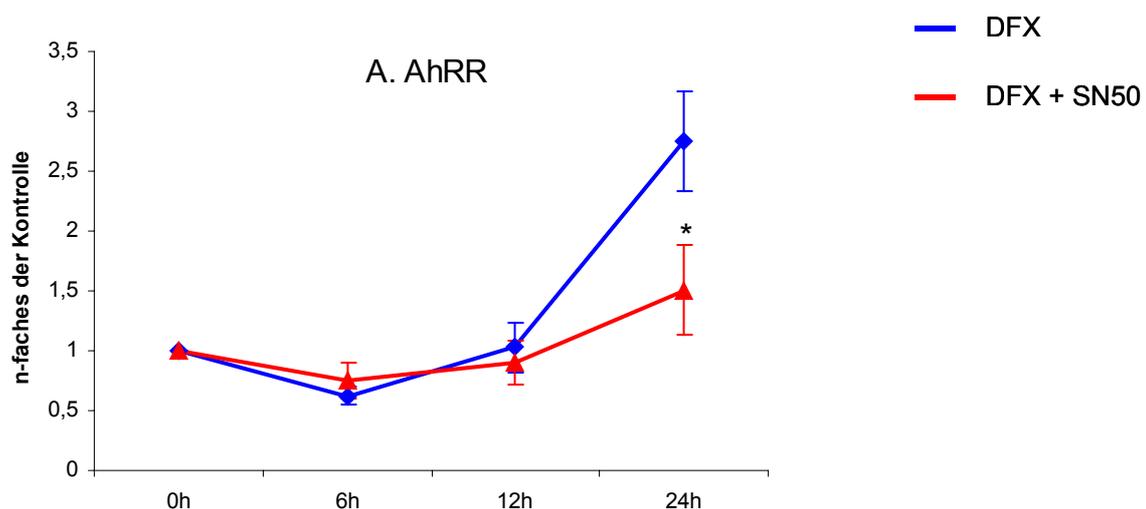
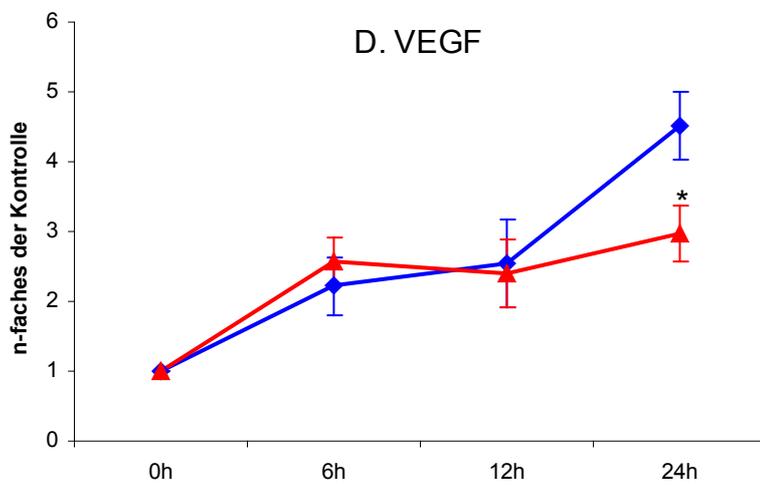
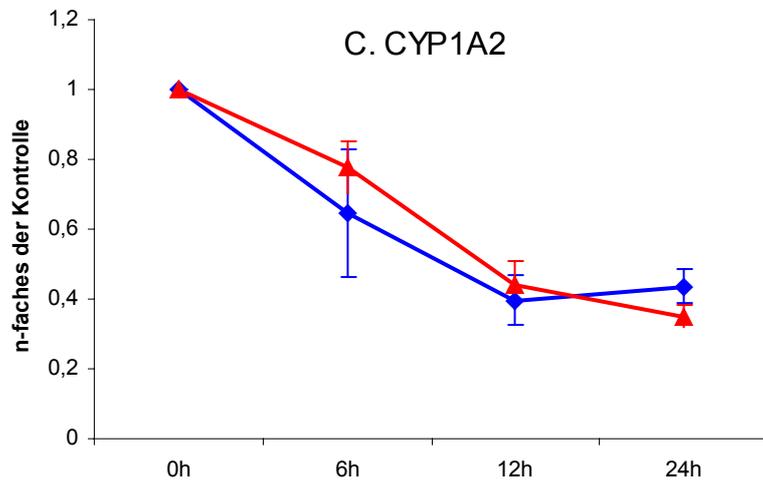
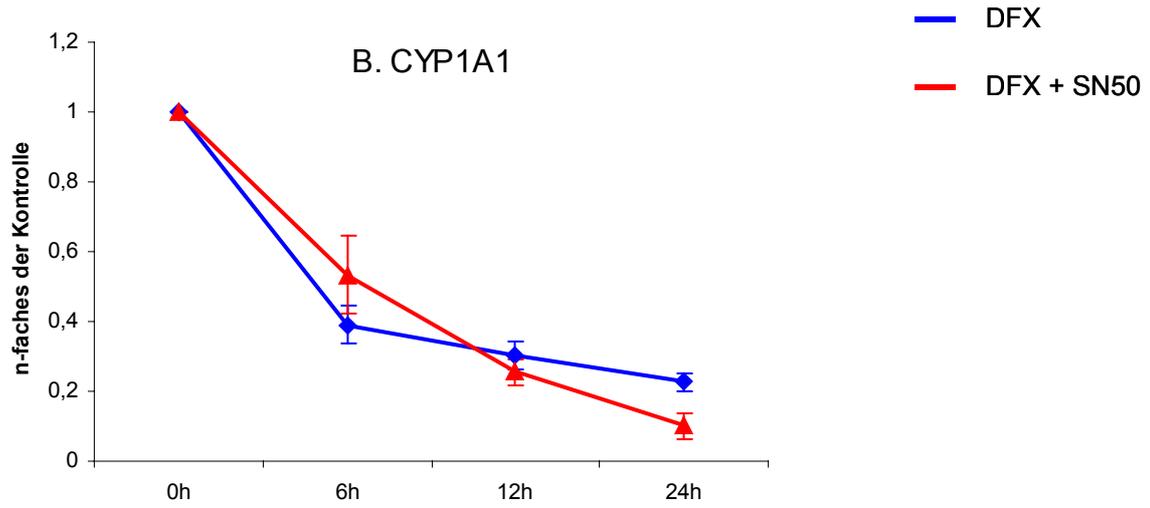


Abb. 18 Wirkung von DFX auf die AhRR-getriebene Luziferase-Aktivität.

HepG2 Zellen wurden mit je 2 μ g der Vektoren *pAhRR* oder *pAhRR- Δ 5* transfiziert und 18h später mit 300 μ M DFX belastet. Nach 48h wurden die Zellen lysiert und die Luc-Aktivitäten bestimmt. Die gemessenen *Firefly*-Aktivitäten wurden gegen die *Renilla*-Aktivitäten normiert und sind hier relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

Die Frage, ob NF- κ B an der DFX-modulierten Expression des AhRR Gens beteiligt ist, wurde durch den Einsatz des spezifischen NF- κ B-Inhibitors SN50 überprüft (Lin et al., 1995). HepG2 Zellen wurden für 6h, 12h und 24h mit 300 μ M DFX alleine und in Kombination mit 50 μ g/ml SN50 behandelt. Anschließend wurde die mRNA Expression von AhRR, CYP1A1, CYP1A2 und VEGF mittels qRT-PCR bestimmt. Zusätzlich wurde die Kopienzahl der HIF-1 α Transkripte gemessen, um zu prüfen, ob SN50 Einfluss auf die Expression dieses Transkriptionsfaktors hat. Wie in Abbildung 19A dargestellt, hatte die Anwesenheit des SN50 Inhibitors in den ersten 18h der Behandlung keinen Einfluss auf die DFX-vermittelte Modulation der AhRR Expression. Nach 24h war eine signifikante Inhibierung der DFX-induzierten AhRR Expression in Gegenwart des SN50 zu beobachten. Die Hypoxie-bedingte Herabregulation der P450 Cytochrome 1A1 und 1A2 wurde durch gleichzeitige Behandlung der HepG2 Zellen mit SN50 nicht signifikant beeinflusst (Abb. 19B/C). Im Vergleich zu den DFX-belasteten Proben zeigten die mit SN50 und DFX behandelten Zellen nach 24h eine signifikante Reduktion des VEGF mRNA Spiegels (Abb. 19D). Die mRNA Expression des bHLH-PAS Moleküls HIF-1 α wurde weder durch die alleinige Behandlung mit DFX noch durch eine kombinierte DFX/SN50-Behandlung signifikant modifiziert (Abb. 19E).





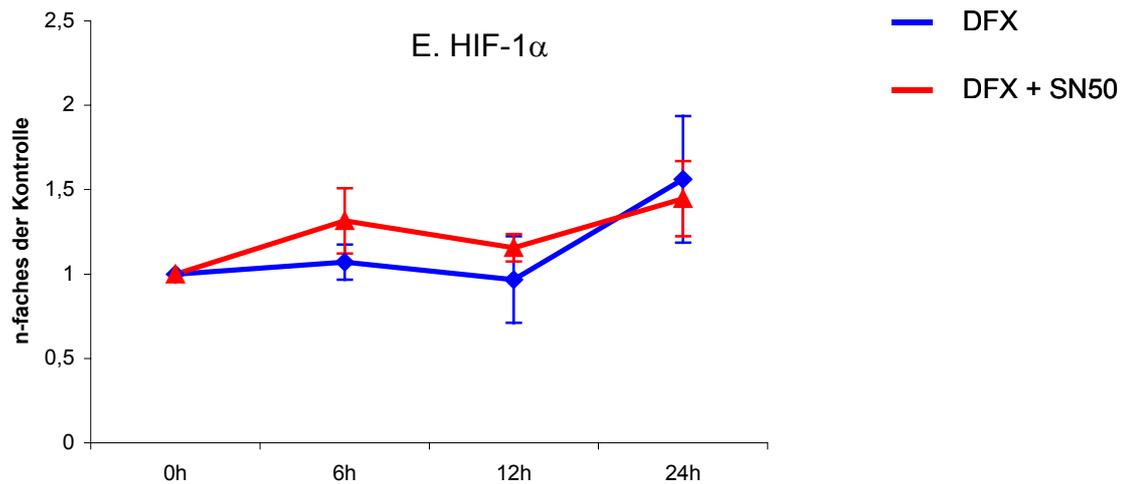


Abb. 19 Einfluss des NF- κ B Inhibitors SN50 auf die DFX-modulierte Genregulation in HepG2 Zellen. HepG2 Zellen wurden für 6h, 12h und 24h mit 300 μ M DFX und einer Kombination von 300 μ M DFX und 50 μ g/ml SN50 behandelt. Im Anschluss erfolgte die qRT-PCR Analyse der AhRR (A), CYP1A1 (B), CYP1A2 (C), VEGF (D) und HIF-1 α (E) Transkription; * = signifikant reduziert im Vergleich zur DFX-behandelten Probe ($p \leq 0,05$).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die zu späteren Messzeitpunkten beobachtete Hypoxie-/DFX-medierte Induktion der AhRR und VEGF mRNA Expression NF- κ B abhängig ist. Für eine mögliche Beteiligung von NF- κ B an der DFX-vermittelten Herabregulierung der CYP1A1- und CYP1A2- Expression gab es keine Hinweise.

3.7 Untersuchungen zum Mechanismus der negativen AhRR Rückkopplung

Auf der Basis extrachromosomaler Überexpressionsstudien wurde der AhRR als Bestandteil einer negativen Rückkopplungsschleife des AhR-Signalwegs beschrieben (Mimura et al., 1999). Nach diesem Model müsste eine Aktivierung der AhRR Genexpression eine zeitlich verzögerte Niedermodellierung der induzierbaren CYP1A1 Transkription zur Folge haben. Induktionsstudien mit 3-MC-belasteten HepG2 Zellen zeigten eine parallele Induktion der AhRR und CYP1A1 mRNA Expression auf (Abb.20). Erste signifikante Änderungen in der AhRR Transkription wurden nach 2h festgestellt. Nach 24h war die AhRR mRNA Expression ca. achtfach, nach 48h ca. 25-fach erhöht (Abb. 20A). Die CYP1A1 Induktion setzte etwas früher ein. Erste statistisch abgesicherte Änderungen wurden nach 40min beobachtet (Abb. 20B). Nach 48-stündiger Exposition gegenüber 3-MC stieg die CYP1A1 Kopienzahl auf mehr

als das 200-fache im Vergleich zur Kontrolle an. Diese Daten lassen nicht auf einen AhRR-vermittelten Rückkopplungsmechanismus der AhR-kontrollierten CYP1A1 Transkription schließen.

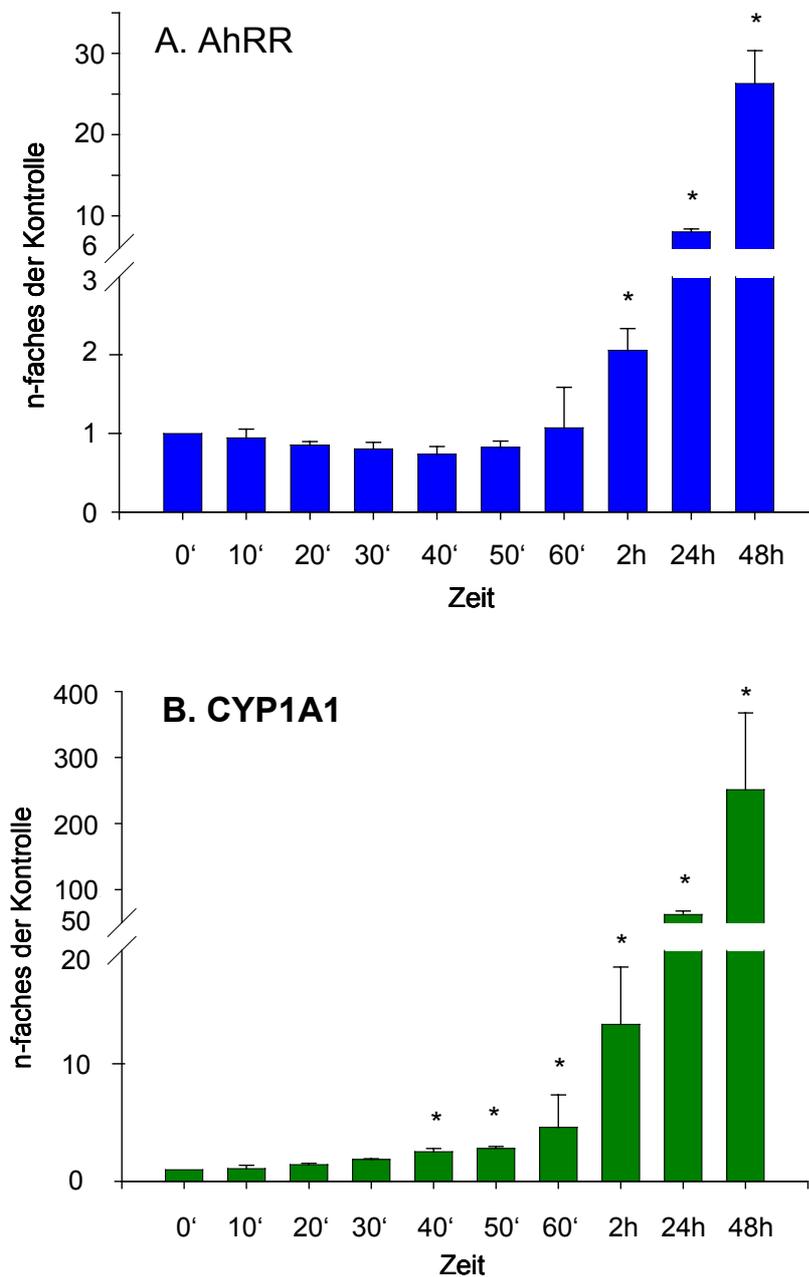


Abb. 20 Zeitreihe: 3-MC-induzierte Genexpression von AhRR und CYP1A1 in HepG2 Zellen.

HepG2 Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit 10 μ M 3-MC belastet. Im Anschluss wurde die mRNA Expression von AhRR (A) und CYP1A1 (B) mittels qRT-PCR-Analyse bestimmt;(* = $p \leq 0,05$).

Die in Fibroblasten und HeLa Zellen beobachtete Korrelation zwischen einer hohen basalen AhRR Transkriptionsrate und der fehlenden Induzierbarkeit von CYP1A1 (Abschnitt 3.1) deutet darauf hin, dass der konstitutiv exprimierte AhRR eine modulierende Rolle in der Regulation der Genexpression des CYP1A1 Gens einnimmt. Diese These sollte durch ein Ausschalten des AhRR in HeLa Zellen belegt werden.

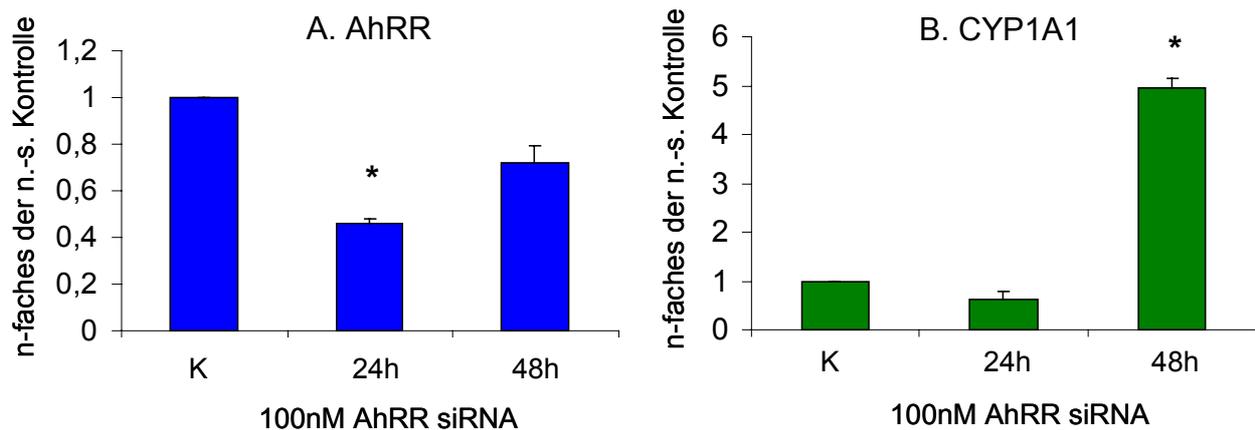


Abb. 21 Genexpression von AhRR und CYP1A1 nach transienter Transfektion mit AhRR siRNA in HeLa Zellen.

HeLa Zellen wurden mit 100nM AhRR siRNA oder 100nM non-silencing Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 24h und 48h erfolgte die Analyse der AhRR (A) und CYP1A1 (B) mRNA Expression mittels qRT-PCR.

(* = $p \leq 0,05$).

Wie in Abbildung 21 gezeigt, führte die Transfektion der HeLa Zellen mit AhRR siRNA zu einer transienten Herabregulierung der AhRR mRNA. Nach 24h betrug der AhRR mRNA Gehalt ca. 45% des Kontrollwertes, nach 48h stieg der Gehalt wieder auf ca. 70% an. Die Transkription des CYP1A1 Gens wurde erst 48h nach der AhRR RNA Interferenz beeinflusst. Die Expressionsrate stieg auf das Fünffache im Vergleich zur Kontrolle an. Die Ergebnisse aus dieser Studie deuten auf eine konstitutive Funktion des AhRR in der Regulation von AhR-Zielgenen wie dem CYP1A1 hin.

3.8 Analyse der molekularen Wirkmechanismen des AhRR

Die in den HeLa Zellen beobachtete konstitutive Regulation des CYP1A1 Gens durch den AhRR, könnte auf eine Bindung des AhRR Proteins an die XRE-Motive des CYP1A1 Gens beruhen. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden ChIP-Analysen mit anti-AhRR Serum in den nicht-responsiven Zelllinien durchgeführt. Mit der anschließenden PCR wurde ein Fragment des humanen CYP1A1 Gens amplifiziert, das zwei responsive XREs enthält (Hestermann & Brown, 2003). Das Ergebnis der ChIP-Analyse in den Fibroblasten ist in Abbildung 22 dargestellt.

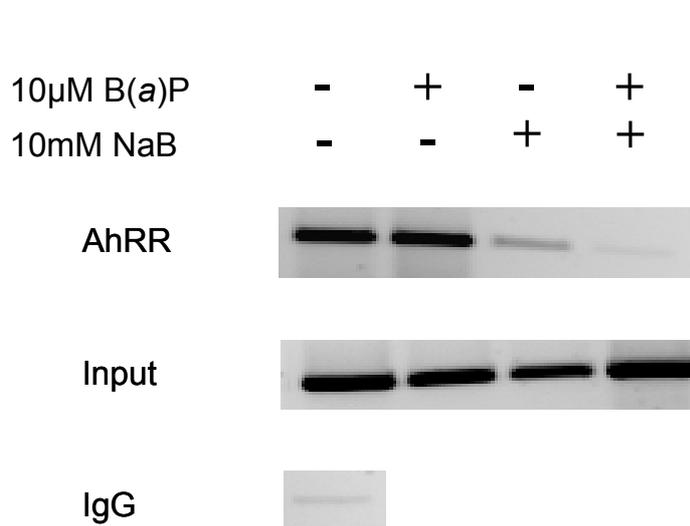


Abb. 22 Untersuchung der AhRR/XRE-Bindung in primären Fibroblasten.

Fibroblasten wurden für 16h mit 10µM B(a)P, 10mM NaB oder B(a)P und NaB behandelt. Nach der Isolation des Chromatins wurde eine IP mit anti-AhRR Serum durchgeführt. In der anschließenden PCR wurde ein XRE-tragendes Fragment des CYP1A1 Promotors amplifiziert. Die zweite Reihe zeigt die Input-Signale, die dritte das Signal der IgG-Negativ-Kontrolle.

Im Vergleich zu der IgG-Kontrolle konnte bereits in den unbehandelten Zellen eine starke XRE-Bindung des AhRR Proteins beobachtet werden. Die Belastung der Zellen mit 10µM des AhR-Agonisten B(a)P hatte keinen Einfluss auf die Bindungsstärke von AhRR/XRE. Aus der Literatur ist bekannt, dass die CYP1A1 Responsivität in HeLa Zellen und Fibroblasten durch den Einsatz von HDAC-Inhibitoren wie Trichostatin A (TSA) oder Natrium-Butyrat wiederhergestellt werden kann (Gradin et al., 1999; Nakajima et al., 2003). Wie in Abbildung 22 dargestellt, führte eine Belastung der Fibroblasten-Kultur mit 10mM der kurzkettigen

Fettsäure NaB zu einer deutlichen Abschwächung der AhRR/XRE-Bindung. Nach kombinierter Gabe von B(a)P und NaB konnte keine weitere Assoziation des AhRR Proteins mit den XRE-Motiven des CYP1A1 Gens beobachtet werden. Eine ähnliche ChIP-basierte Untersuchung der AhRR/XRE-Bindung in HeLa Zellen führte zu dem gleichen Ergebnis (Abb. 23). Die beobachtete konstitutive DNA-Bindung des AhRR wurde durch die Exposition mit dem HDAC-Inhibitor aufgelöst.

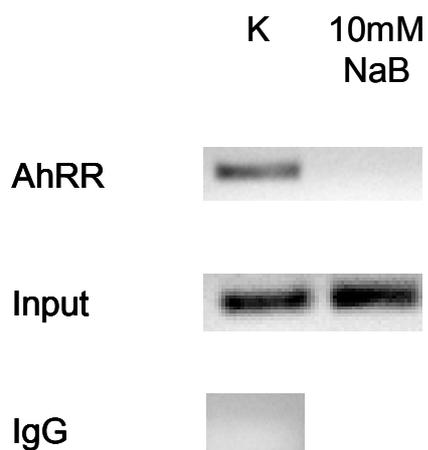


Abb. 23 Untersuchung der AhRR/XRE-Bindung in HeLa Zellen.

HeLa Zellen wurden für 16h mit 10mM NaB oder frischem Medium behandelt. Die Chromatinproben wurden mit dem anti-AhRR Serum präzipitiert. Mittels PCR wurde die Bindung des AhRR Proteins an eine XRE-enhaltende Region des CYP1A1 Gens untersucht. In Reihe zwei sind die Input-Proben, in Reihe 3 die IgG-Negativ-Kontrolle gezeigt.

Ob diese, auf Ebene des Chromatins, beobachteten Veränderungen tatsächlich für die Expression des CYP1A1 Gens von funktioneller Bedeutung sind, wurde mit Hilfe von qRT-PCR-Analysen untersucht. In den primären Fibroblasten und HeLa Zellen resultierte bereits die Belastung der Zellen mit NaB alleine in einem signifikanten, zwei- bzw. 30-fachen Anstieg der CYP1A1 mRNA Expression im Vergleich zu den Kontrollproben (Abb. 24). Durch die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit NaB und B(a)P wurde eine ca. 200-fache Erhöhung der CYP1A1 Transkripte in den Fibroblasten induziert. In den HeLa Zellen konnte eine 400-fache Induktion der CYP1A1 Antwort gemessen werden (Abb. 24). In Kombination mit den ChIP-Analysen kann man diesen Daten entnehmen, dass der in HeLa und Fibroblasten Zellen konstitutiv hoch exprimierte AhRR die Induzierbarkeit von CYP1A1 reprimiert. Die Tatsache dass dieser Effekt durch NaB aufgehoben werden kann, deutet auf eine Beteiligung von HDAC-Aktivitäten hin.

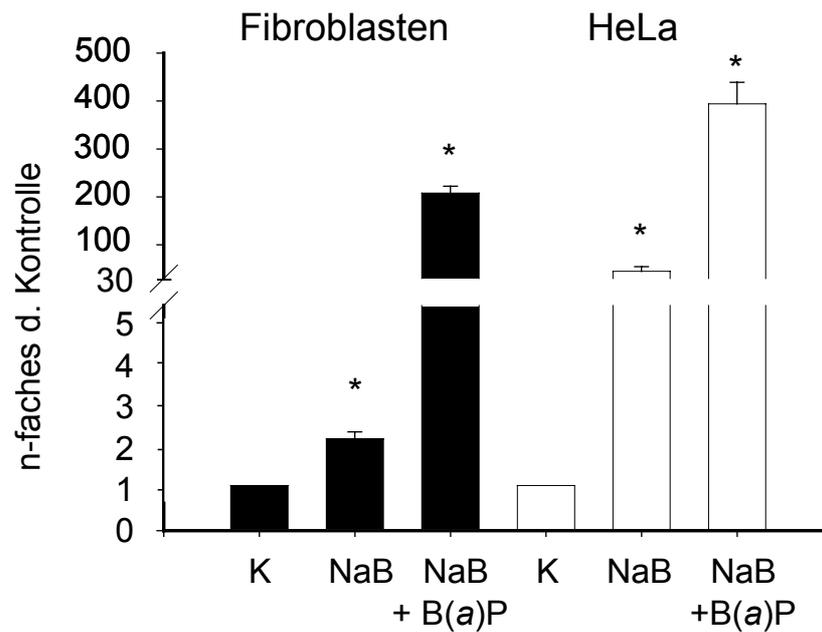


Abb. 24 Einfluss von NaB auf die konstitutive und induzierbare Expression von CYP1A1 in primären fibroblasten und HeLa Zellen.

Fibroblasten und HeLa Zellen wurden für 24h mit 10mM NaB oder einer Kombination von 10mM NaB und 10 μ M B(a)P belastet. Mit Hilfe der qRT-PCR wurden Änderungen in der Genexpression von CYP1A1 notiert; (* = $p \leq 0,05$).

Durch die in Abb. 25 gezeigte Co-Immunpräzipitation, konnte eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen dem AhRR und dem HDAC Isoenzym 1 bewiesen werden (linke Spur). In der Mitte ist die IgG Negativkontrolle aufgetragen, rechts HeLa Kernprotein als positive Kontrolle.



Abb. 25 Co-Immunpräzipitation von HDAC-1 und AhRR in HeLa Zellen.

Aus HeLa Zellen gewonnenes Kernprotein wurde mit Hilfe eines HDAC-1 Antikörpers präzipitiert. Das Präzipitat wurde einer Western Blot-Analyse unterzogen, die Membran wurde mit anti-AhRR Serum detektiert. Die mittlere Spur zeigt die IgG Kontrolle, die rechte Spur die positive Kontrolle, Kernprotein aus HeLa-Zellen.

3.9 Besonderheiten der AhRR Regulation in A549 Zellen

Die untersuchte Lungenkarzinomzelllinie A549 zeigte im Laufe der Experimente einige zellspezifische Besonderheiten auf.

Wie in Abschnitt 3.1 gezeigt, war die gemessene konstitutive AhRR Expression in den A549 Zellen relativ niedrig. Sie war mit der in HepG2 Zellen vergleichbar. Im Gegensatz zu den HepG2 konnte in den A549 Zellen keine Induktion der AhRR Transkription durch AhR-Agonisten beobachtet werden. Auch die AhR-abhängige Induzierbarkeit des CYP1A1 Gens war in den A549 Zellen deutlich geringer ausgeprägt. ChIP-Analysen mit 3-MC-behandelten HepG2 und A549 Zellen zeigten Unterschiede in der Bindungsstärke zwischen dem AhRR und dem CYP1A1 XRE (Abb. 26). In den HepG2 Zellen konnte weder in den 3-MC- noch in den Kontroll-Proben eine Bindung des AhRR Proteins an das XRE-enthaltende Fragment des CYP1A1 Promotors beobachtet werden. In den A549 Zellen konnte eine konstitutive Bindung zwischen dem AhRR und den XRE-Motiven nachgewiesen werden.

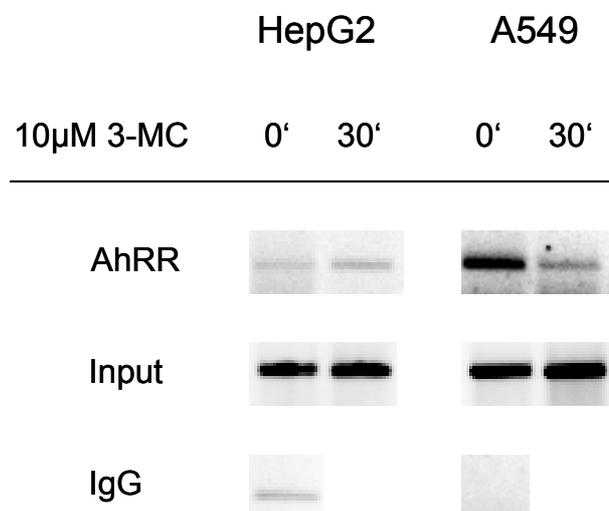


Abb. 26 ChIP-Analyse der AhRR-Bindung an XRE-Motive des CYP1A1-Gens.

HepG2 und A549 Zellen wurden für 30min mit 10 μ M 3-MC belastet. Anschließend wurden die Zellen einer ChIP Analyse mit anti-AhRR Serum unterzogen. Als Kontrolle wurde je einer Probe während der IP IgG zugesetzt. Aus den erhaltenen DNA-Proben wurde mit Hilfe der PCR die CYP1A1 XRE-Bindung des AhRR Proteins untersucht.

Im Gegensatz zu den Fibroblasten (Abb. 22) schwächte die AhRR/XRE-Bindung jedoch in dieser Zelllinie in Gegenwart eines AhR-Liganden ab (Abb. 26). Durch weiterführende ChIP-Analysen mit unbehandelten A549 Zellen konnten die konstitutiven Bindungen mehrerer Proteine an den CYP1A1 XRE-Motiven gezeigt werden (Abb. 27). Neben der XRE-Bindung des AhRR konnte diese auch für mehrere Isoenzyme der HDAC-Familie gezeigt werden. Wie in der densitometrischen Auswertung zu sehen ist, konnten relativ starke Bindungssignale für HDAC-1 und -4 festgestellt werden (Abb. 27). Schwächere Signale wurden für die XRE-Bindung der HDAC-Formen 5 und 6 gemessen. Für die HDAC Moleküle 3 und 7 konnte kein Signal der DNA-Bindung detektiert werden.

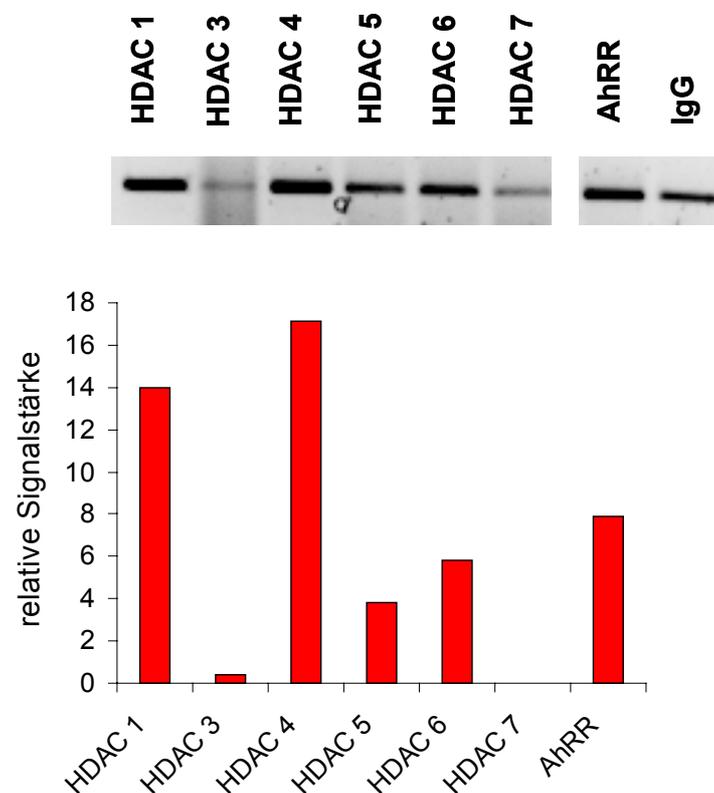


Abb. 27 ChIP-Analyse der AhRR-Bindung an XRE-Motive des CYP1A1-Gens.

HepG2 und A549 Zellen wurden für 30min mit 10 μ M 3-MC belastet. Anschließend wurden die Zellen einer ChIP Analyse mit anti-AhRR Serum unterzogen. Als Kontrolle wurde je einer Probe während der IP IgG zugesetzt. Aus den erhaltenen DNA-Proben wurde mit Hilfe der PCR die CYP1A1 XRE-Bindung des AhRR Proteins untersucht. In der densitometrischen Auswertung wurde das IgG-Signal von dem Signal der Proben subtrahiert.

Die Ergebnisse aus diesen ChIP-Experimenten implizieren, dass eine geringe konstitutive Expression des AhRR in den A549 Zellen ausreichend ist, um die Induzierbarkeit von CYP1A1 abzuschwächen. Des Weiteren verstärkt die gleichzeitige Präsenz des AhRR und verschiedener HDAC-Proteine an den CYP1A1 XRE-Motiven die in Abschnitt 3.8 gewonnene Erkenntnis, dass die Funktion des AhRR von HDAC-Aktivitäten abhängig ist. HDAC-Moleküle sind wiederum häufig mit Methyl-CpG-bindenden Proteinen (MeCP) und damit mit dem Status der DNA-Methylierung assoziiert. In der Literatur ist beschrieben, dass die Regulation des CYP1A1 Gens in A549 Zellen durch Prozesse der DNA-Methylierung kontrolliert wird (Anttila et al., 2003). Deshalb wurde der Einfluss von 5'-Azacytidin (5'-Aza) auf die Expression von AhRR und CYP1A1 in den A549 Zellen untersucht. 5'-Aza ist ein Inhibitor der DNA-Methyltransferasen, der die nach jeder Replikation ablaufende Methylierung der CpG-Inseln unterbindet (Christman, 2002). Weiterhin wurde auch die Wirkung des HDAC-Inhibitors NaB auf die AhRR Expression untersucht (Tab. 3). Die A549 Zellen wurden für 48h mit 10µM 5'-Aza oder 10mM NaB alleine belastet oder mit den Kombinationen 5'-Aza/B(a)P und NaB/B(a)P behandelt.

Tab. 3 Einfluss des DNA-Methyltransferase-Inhibitors 5'-Aza und des HDAC-Inhibitors NaB auf die konstitutive und die induzierbare mRNA Expression von AhRR und CYP1A1 in A549 Zellen.

A549 Zellen wurden mit 10µM 5'-Aza oder 10mM NaB sowie mit einer Kombination beider Substanzen mit 10µM B(a)P behandelt. Nach 48h wurde die RNA isoliert und die Transkriptaten von AhRR und CYP1A1 mittels qRT-PCR bestimmt.

	AhRR	CYP1A1
10µM 5'-Aza	1,22 ± 0,11	5,74 ± 2,65
10µM 5'-Aza +10µM B(a)P	6,35 ± 0,32	102,82 ± 9,57
10mM NaB	1,17 ± 0,39	0,23 ± 0,06
10mM NaB +10µM B(a)P	10,22 ± 0,73	12,20 ± 1,78

Die Behandlung mit 5'-Aza alleine führte zu keiner signifikanten Änderung der AhRR Genexpression. Im Gegensatz dazu wurde die CYP1A1 Transkription ca. sechsfach induziert. Durch eine Kombination mit 10 μ M B(a)P wurde die AhRR mRNA sechsfach, die CYP1A1 mRNA ca. 100-fach erhöht. Dieser Befund deutet auf eine mögliche Methylierung der regulatorischen DNA Sequenzen von AhRR und CYP1A1 in der A549 Zelllinie hin.

Die Belastung der Zellen mit NaB resultierte in keinen messbaren Veränderungen der AhRR mRNA Expression (Tab. 3). Durch eine Co-Behandlung mit B(a)P wurde der AhRR mRNA Gehalt um das zehnfache erhöht. Die CYP1A1 Genexpression wurde durch die kombinierte Belastung mit NaB und B(a)P um das zwölfwache induziert. Überraschenderweise zeigten die NaB-exponierten A549 Zellen eine Reduktion der CYP1A1 mRNA Expression um ca. 75% im Vergleich zur Kontrolle auf. Für die fehlende Induzierbarkeit des AhRR-Gens in den A549 Zellen scheinen beide epigenetischen Prozesse, sowohl DNA-Methylierung als auch Histon Deacetylierung, relevant zu sein. Die relativ geringe Induzierbarkeit der CYP1A1 mRNA stellte sich als deutlich sensitiver gegenüber DNA-Methylase-Hemmern heraus.

Um die Regulation des humanen AhRR-Gens durch abweichende Muster der DNA-Methylierung nachzuweisen, müssten alle putativen regulatorischen DNA-Abschnitte des Gens mit Hilfe geeigneter Analysemethoden, beispielsweise der Bisulfit-Sequenzierung, untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein ca. 370bp langer Sequenzabschnitt untersucht, der unmittelbar vor dem ATG Startcodon lokalisiert ist (+39.328 bis +39.599). Diese DNA-Sequenz ist Teil der Insertionen der responsiven Vektoren *pAhRR-2* und *pAhRR-3* (Abb. 9) und enthält ein funktionelles XRE (Kohli, 2006). Eine mögliche abweichende Methylierung dieser DNA-Sequenz in den A549 Zellen wurde durch vergleichende Analysen mit der entsprechenden Sequenz aus den responsiven HepG2 Zellen durchgeführt. Nach der Isolation genomischer DNA aus beiden Zelllinien wurden die nicht-methylierten Cytosine, mit Hilfe der Bisulfit-Methode, in Uracile umgewandelt. Durch nachfolgende Amplifikation und Sequenzierung konnten Unterschiede im DNA-Methylierungsmuster beider Zellen überprüft werden. Zusätzlich wurde eine Datenbank-Analyse mit dem Programm *MethPrimer* durchgeführt, dass die Lokalisation potentiell methylierter CpG-Inseln berechnet.

MethPrimer	GTTTGGAGGCTGCAGGCTGCCAGGCCTTGGCTG	CGCCC	CGCCC	CGCC	CGTTCC	TGGCTT
A549	GTTTGGAGGTTGTAGGTTGTTTAGGTTTGGTTG	CGTTT	CGTTT	CGTT	CGTTT	TGGTTT
HepG2	GTTTGGAGGTTGTAGGTTGTTTAGGTTTGGTTG	CGTTT	CGTTT	CGTT	CGTTT	TGGTTT
		**	**	**	**	
MethPrimer	CCTCGATGGCTTCCTCCTCAGGA	CGCG	GGTCTCC	CGCCA	CGGCG	CCCTGAGCCAGGCTCC
A549	TTTCGATGGTTTTCCTCCTCAGGACCGT	CGGT	TTTTCGTT	ACGGT	TTTT	TGAGTTAGGTTT
HepG2	TTTCGATGGTTTTCCTCCTCAGGACCGT	CGGT	TTTTCGTT	ACGGC	TTTT	TGAGTTAGGTTT
		**	** **	**	** **	**
MethPrimer	AGAGCAGGCGGCTTCTCTGGGGGAGGC	CGGG	ACC	CGCCT	GACAC	CGAGGGGAGGCCAGG
A549	AGAGTAGGCGGTTTTCCTCCTCAGGACCGT	CGGG	ATT	CGTT	TGATAT	CGAGGGGAGGTTTAGG
HepG2	AGAGTAGGCGGTTTTCCTCCTCAGGACCGT	CGGG	ATT	CGTT	TGATAT	CGAGGGGAGGTTTAGG
		**	**	**	**	
MethPrimer	CGTGACCCGGCCCCGGTGGCTCCTCGGTG	CGGG	TGCTGG	GAGAG	CAGGG	TCCCGGCCA
A549	CGTGATT	CGGTTT	CGGTGG	TTTT	TCGGT	CGGGTGTGGAGAGTAGGGTTTCGGGTTA
HepG2	CGTGATT	CGGTTT	CGGTGG	TTTT	TCGGT	CGGGTGTGGAGAGTAGGGTTTCGGGTTA
		**	**	**	**	**
MethPrimer	GGGGGTCCCA	CGAGG	AGGAGC	AGGAGG	TGGG	
A549	GGGGGT	TTTAT	TGAGG	AGGAGG	TGGG	
HepG2	GGGGGT	TTTAT	TGAGG	AGGAGG	TGGG	
		**				

Abb. 28 Bisulfit-Modifikation einer regulatorischen Region des humanen AhRR Gens in A549 und HepG2 Zellen.

Die *MethPrimer*-Sequenz repräsentiert die genomische Sequenz. Die rot markierten CpG-Inseln wurden als methyliert berechnet. Rote Sterne markieren eine Übereinstimmung zwischen *MethPrimer*- und bisulfitmodifizierten A549- und HepG2-Sequenzen. Blaue Sterne markieren beobachtete Abweichungen des Methylierungsmusters. Die durch Bisulfit umgewandelten, nicht-methylierten Cytosine sind gelb unterlegt. Die grau hinterlegte Sequenz zeigt die Position eines funktionellen XRE-Motives an.

In beiden Zelllinien wurde, mit Ausnahme von zwei CpG-Inseln, das von *MethPrimer* vorausgesagte DNA-Methylierungsmuster gefunden (Abb. 28). Der Vergleich zwischen dem Methylierungsmuster der A549 und HepG2 Proben zeigte keine Unterschiede. In den HepG2 Zellen war lediglich eine CpG-Insel methyliert die in den A549 Zellen nicht methyliert vorlag. Die in diesem Genabschnitt enthaltene XRE-Kernsequenz lag in beiden Zelllinien methyliert vor. Auf Grund der geringfügigen Unterschiede im Grad der DNA-Methylierung dieses Fragmentes kann eine Variation im Methylierungsmuster nicht zu den beobachteten unterschiedlichen Responsivitäten des AhRR Gens in A549 und HepG2 Zellen führen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass andere regulatorische Bereiche des AhRR Gens in A549 Zellen ein abweichendes CpG-Methylierungsmuster aufweisen.

4 Diskussion

Der AhR stellt ein intrazelluläres Sensormolekül für toxische Chemikalien wie TCDD und strukturell verwandte planare Aromaten dar. Über unsere Umwelt geraten wir täglich mit Kleinstmengen dieser Substanzen in Kontakt, die sich auf Grund ihres meist lipophilen Charakters in unserem Körper akkumulieren. Eine genaue Vorstellung ob und welche gesundheitlichen Folgen diese Fremdstoffexposition für unseren Körper hat, haben wir nicht. In einer Zeit, in der umweltinduzierte Krankheiten auf dem Vormarsch sind, ist es wichtig, grundlegende Kenntnisse über Ursachen, Folgen und Interventionsmöglichkeiten von fremdstoffaktivierten Signalwegen, wie der AhR-Kaskade, zu gewinnen.

Der vor einigen Jahren entdeckte AhR Repressor stellt einen neuen potentiellen Regulationsmechanismus der AhR-Signaltransduktion dar. Extrachromosomale Überexpressionsstudien des AhRR führten zu einer Hemmung der Expression des AhR-Zielgens CYP1A1 (Mimura et al., 1999). Da die Transkription des AhRR durch das AhR/ARNT-Dimer kontrolliert wird, stellt der AhRR somit eine Form von negativer Rückkopplung für die AhR-Kaskade dar (Mimura et al., 1999). Wie und in welchem Ausmaß der AhRR in die Expression von AhR-Zielgenen eingreift, und welche Konsequenzen dieses für die AhR-medierte Toxizität von Umweltchemikalien hat, ist unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Grundlagen der AhRR Genexpression und der molekularen Funktion dieses Moleküls untersucht werden. Als Untersuchungsobjekt wurden verschiedene humane Zelllinien, drei transformierte und eine primäre, gewählt. Die gewonnenen Daten und Befunde sollen ein Fundament für weiterführende Studien liefern, welche die Charakterisierung des AhRR innerhalb AhR-vermittelter Prozesse wie Toxizität und Induktion des Fremdstoffwechsels als Fernziel haben.

4.1 Charakterisierung der verwendeten Zelllinien: Expression von AhRR und CYP1A1

Die für die Untersuchungen verwendeten humanen Zelllinien wurden zunächst hinsichtlich ihrer konstitutiven und induzierbaren mRNA Expression von AhRR und CYP1A1 charakterisiert. Wie im nachfolgendem Abschnitt beschrieben, können die gewählten Zelllinien hinsichtlich ihrer konstitutiven, als auch durch AhR-Agonisten induzierten Genexpression, in drei Gruppen eingeteilt werden: die responsiven HepG2 Zellen, die schwach responsiven A549-Zellen sowie die nicht-responsiven primären Fibroblasten und HeLa Zellen.

In Übereinstimmung mit der Literatur weisen die primären Fibroblasten und HeLa Zellen im Vergleich zu den A549 und HepG2 Zellen eine deutlich höhere basale AhRR Transkription auf (Abb. 5A) (Gradin et al., 1993; Gradin et al., 1999; Tsuchiya et al., 2003a). Vergleicht man diese Daten mit *in vivo* Befunden, so spiegelt sich die in A549 und HepG2 Zellen beobachtete niedrige basale AhRR mRNA Expression in den ursprünglichen Organen Lunge bzw. Leber wieder (Tsuchiya et al., 2003a). Im Gegensatz zu der hohen AhRR Transkription in den epithelialen Zervixkarzinomzellen HeLa ist die konstitutive Expression dieses Gens in den Zellen des Uterusgewebes im Vergleich zu anderen Organen deutlich geringer (Tsuchiya et al., 2003a). Wie in der Literatur beschrieben, resultierte die Behandlung der untersuchten Zelllinien mit dem AhR-Agonisten B(a)P nur in den HepG2 Zellen in einer signifikanten Steigerung der AhRR Expression (Abb. 6A) (Tsuchiya et al., 2003a). In den A549, primären Fibroblasten und HeLa Zellen konnte keine Induktion der AhRR mRNA beobachtet werden.

Das CYP1A1 Gen wird in der Literatur häufig als „konstitutiv nicht exprimiert“ bezeichnet (Gradin et al., 1993; Kress & Greenlee, 1997). Es ist anzumerken, dass diese Befunde jedoch auf *Northern Blot* Analysen zurückgehen. Durch Einsatz der sensitiveren RT-PCR-Technik konnte eine konstitutive Transkription des CYP1A1 Gens in diversen humanen Zelllinien gezeigt werden (Iwanari et al., 2002; Nakajima et al., 2003). Die durchgeführten RT-PCR-basierten Analysen der konstitutiven CYP1A1 Expression zeigten im Vergleich zu den extrahepatischen Zelllinien einen deutlich, ca. 300-fach erhöhten mRNA Gehalt in den HepG2 Zellen auf (Abb. 5B). Eine solche Differenz zwischen dem basalen CYP1A1-Gehalt von HepG2, A549 und HeLa Zellen wird zwar von der Literatur gestützt (Iwanari et al., 2002), allerdings erscheint die Spanne der Differenz relativ groß. Durch eine sechsstündige

Belastung der verschiedenen Zelllinien mit B(a)P kam es in den HepG2 Zellen zu einer vierfachen Induktion der CYP1A1 mRNA Expression (Abb. 6B). In den A549 Zellen wurde eine zweifache B(a)P-aktivierte Induktion der CYP1A1 mRNA erzielt (Abb. 6B). Die Responsivität des CYP1A1 Gens gegenüber AhR-Liganden in den A549 Zellen ist in der Literatur kontrovers beschrieben. Während in einigen Studien eine hohe Responsivität gegenüber TCDD beschrieben wurde (Vogel et al., 1994; Döhr et al., 1997; Hukkanen et al., 2000), konnten Iwanari und Kollegen abhängig von der Wahl des Liganden keine bis sehr geringe CYP1A1 Induktionsraten messen (Iwanari et al., 2002). Wie bereits in anderen Studien beobachtet wurde, konnte in den Zellen mit hoher basaler AhRR mRNA Expression, Fibroblasten und HeLa, keine signifikante Änderung der CYP1A1 Transkription nach B(a)P-Exposition notiert werden (Abb. 6B) (Gradin et al., 1993; Gradin et al., 1999; Iwanari et al., 2002; Nakajima et al., 2003).

Diese Daten implizieren eine Korrelation zwischen der Höhe der konstitutiven AhRR Expression und der AhR-vermittelten Induzierbarkeit des CYP1A1 Gens. Dieser Zusammenhang spricht für eine regulatorische Funktion des AhRR in der transkriptionellen Aktivierung des CYP1A1 Gens. Die Ergebnisse von Tsuchiya und Kollegen bestärken zwar diese These, zeigen allerdings eine Ausnahme auf (Tsuchiya et al., 2003a). Obwohl die Ovarkarzinomzellen OMC-3 eine hohe basale AhRR mRNA Expression aufweisen, führt eine Belastung der Zellen mit TCDD zu einer ca. 40-fachen Induktion der CYP1A1 mRNA. Dieser Befund deutet auf eine mögliche Diskrepanz zwischen AhRR mRNA-Konzentration und Protein-Gehalt in diesen Zellen hin. Interessanterweise kann in den Zellen, die eine induzierbare CYP1A1 Expression aufweisen, auch eine AhR-abhängige Induktion des AhRR Gens beobachtet werden (Abb. 5 & 6) (Tsuchiya et al., 2003a). Das AhR-Zielgen CYP1A1 wird in den HepG2 Zellen trotz steigender Transkriptionsrate des AhRR verstärkt exprimiert (Abb. 5 & 6). Diese Beobachtung widerspricht dem postuliertem Rückkopplungs-Mechanismus des AhRR, nachdem ein Anstieg der AhRR Expression eine Reduktion der CYP1A1 Expressionsrate zur Folge haben müsste (Mimura et al., 1999). In den konstitutiv stark AhRR-exprimierenden Fibroblasten und HeLa Zellen zeigt sich das AhRR Gen ebenfalls als nicht induzierbar, was auf einen möglichen autoregulatorischen Mechanismus der AhRR Transkription schließen lässt. Die relativ schwache Responsivität des CYP1A1 Gens in den A549 Zellen korreliert nicht mit einer hohen AhRR mRNA Expression. Dieses lässt vermuten, dass in diesen Zellen andere molekulare Mechanismen für die Repression des CYP1A1 Gens verantwortlich sind (Tsuchiya et al., 2003a).

4.2 Regulation der humanen AhRR Genexpression

Mimura und Mitarbeiter identifizierten 1999 den murinen AhRR Locus als ein weiteres Zielgen des AhR-Signalwegs (Mimura et al., 1999). Die Expression des murinen AhRR wird durch mindestens drei responsive XRE-Motive in der 5'-Region des Gens kontrolliert (Baba et al., 2001). Durch weitere Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass neben den XRE-Sequenzen auch andere regulatorische DNA-Motive in die Modulation der AhRR Transkription involviert sind. Neben drei funktionellen GC Boxen wurde eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor NF- κ B gefunden, die aktivierendes Potential besitzt (Baba et al., 2001). Auch in der 5'-Region des AhRR Gens der Ratte wurden zwei XRE-Motive als responsiv identifiziert (Nishihashi et al., 2006). Außerdem konnten weitere putative Elemente lokalisiert werden, deren Responsivität jedoch noch nicht geklärt ist. Neben drei potentiellen NF- κ B-Bindestellen wurden zwei putative GC Boxen beschrieben (Nishihashi et al., 2006). Die molekularen Regulationsmechanismen der humanen AhRR Transkription wurden bisher nur *in silico*, mit Hilfe von Datenbank-Analysen und Spezies-übergreifenden Sequenzvergleichen beschrieben (Baba et al., 2001; Cauchi et al., 2003). Das humane AhRR Gen unterscheidet sich in seiner Struktur erheblich von dem der Nagetiere. Das humane Gen ist auf Chromosom 5p15.33 kodiert, erstreckt sich über ca. 130kb und besteht aus 12 Exons (Abb. 7). Das AhRR Gen der Nager hingegen setzt sich aus nur 11 Exonstrukturen zusammen, die über eine Länge von etwa 60kb kodiert sind. Das ATG-Startcodon des humanen AhRR Gens ist in Exon 2 lokalisiert, Exon 1 ist somit nicht proteinkodierend. Die regulatorischen DNA-Abschnitte des humanen Gens sind im Gegensatz zu den Promotorregionen des Nagetier AhRR im Intron 1 lokalisiert und stellen somit eine interne Promotor- oder Enhancer-ähnliche Region da (Cauchi et al., 2003; Haarmann-Stemann & Abel, 2006). Wie schon für das humane AhR Gen (Wolff et al., 2001) oder die murinen Gene HIF-1 α und ARNT (Luo et al., 1997; Wang et al., 1998) beschrieben, wurde auch innerhalb des humanen AhRR Gens bisher keine TATA-Box lokalisiert. In vorangegangenen Studien wurde bereits ein 1,8kb langer DNA-Abschnitt mit regulatorischer Aktivität kloniert. Dieser ist unmittelbar 5'-aufwärts des Startcodons lokalisiert (*pAhRR-2* bzw. *pAhRR-3*) (Kohli, 2006). Neben zwei responsiven XRE-Motiven wurden vier putative GC Boxen in diesem Sequenzbereich identifiziert. Die Responsivität dieser Konstrukte gegenüber dem AhR-Agonisten 3-MC wurde durch Reporter-Gen Analysen bestätigt (Abb. 9).

Identifikation responsiver XRE-Motive im Intron 1 des humanen AhRR Gens

Das klonierte 1,025kb lange Fragment (*pAhRR*) ist zentral in der 40kb langen Sequenz des Intron 1 lokalisiert und liegt somit ca. 18kb vor dem ATG-Startcodon. Derartige Entfernungen zwischen regulatorischen Elementen und dem Startcodon sind in höher organisierten Genomen häufig aufzufinden und werden durch übergeordnete chromosomale Strukturen (*chromosomal looping*) überbrückt (Dekker, 2003). Das klonierte Fragment (Abb. 8) enthält vier putative XRE-Motive von denen eins (XRE-3) mit Hilfe von Reporter-Gen Analysen und Generierung von Deletionskonstrukten als 3-MC-responsiv identifiziert worden ist (Abb. 9 & 10). Das in Konstrukt *pAhRR-Δ5*-enthaltene identifizierte XRE-3 ist an Basenposition +17.507 des AhRR Gens lokalisiert und enthält eine klassische 5'-GCGTG-3' Kernsequenz (Denison et al., 1988). Die Aktivierung des XRE-3 durch 3-MC kann durch den Einfluss des spezifischen AhR-Antagonisten MNF unterbunden werden (Abb. 11), wodurch die Abhängigkeit dieses Prozesses von dem ligandengebundenen AhR/ARNT-Komplex deutlich wird.

Die Funktionalität des XRE-3 wurde durch ChIP Analysen in HepG2 Zellen bestätigt (Abb. 12). Bereits in den unbehandelten Proben konnte eine konstitutive Bindung der untersuchten Proteine AhR, ARNT und AhRR an das XRE-3-Motiv festgestellt werden. Die Belastung der Zellen mit 3-MC führte zu einer oszillierenden DNA-Bindung der drei getesteten Proteine, wodurch eine Beteiligung von AhR, ARNT und AhRR an der XRE-3-vermittelten Regulation des humanen AhRR Gens bestätigt wurde (Abb. 12). Eine ähnlich variable XRE-Bindung wurde für den AhR und assoziierte Co-Aktivatormoleküle innerhalb der Promotorregion des humanen CYP1A1 Gens beobachtet (Hestermann & Brown, 2003). Interessanterweise konnten die Autoren zeigen, dass diese zyklische XRE-Bindung des AhR mit der DNA-Bindung von Histon-Acetylasen und der RNA Polymerase II korreliert. Dieser Befund unterstreicht die Komplexität und Variabilität der molekularen Transkriptionsmaschinerie.

Durch die beobachtete zyklische Bindung des AhRR an sein eigenes XRE-3-Motiv konnte erstmals gezeigt werden, dass die AhRR Transkription über einen autoregulatorischen Mechanismus gesteuert wird. Die beobachtete konstitutive XRE-Bindung von AhR und ARNT in Abwesenheit eines exogenen Liganden wirft die Frage nach dem Grund der Aktivierung dieses heterodimeren Transkriptionsfaktors auf (Abb. 12). Eine mögliche

Erklärung könnte eine konstitutiv aktivierte Form des AhR in den HepG2 Zellen sein, ein Phänomen, das bereits für die Mammakarzinomzelllinie Hs578T beschrieben worden ist (Kim et al., 2000). Eine andere mögliche Ursache könnte die durch Laborlicht induzierte Bildung bestimmter Tryptophan-Derivate (z.B. 6-Formylindolo[3,2-*b*]Carbazol) im Kulturmedium der Zellen sein (Öberg et al., 2005). Diese Photoprodukte besitzen eine hohe Affinität zum AhR und sind laut den Autoren für ein gewisses Maß an Hintergrundaktivität der AhR-Signalkaskade in kultivierten Zelllinien verantwortlich.

Sind GC Boxen an der Regulation des humanen AhRR Gens beteiligt?

Mit der Identifizierung des XRE-3 konnte somit ein weiterer regulatorischer Bereich im Intron 1 des AhRR Gens identifiziert werden. Wie in Abbildung 8 gezeigt, befinden sich zwei putative GC Box-Motive innerhalb der klonierten Region des Intron 1 (*pAhRR*). Da die Transkription des murinen AhRR Gens durch GC Box-abhängige Prozesse moduliert wird (Baba et al., 2001), wurde eine mögliche Beteiligung dieser putativen Bindungsmotive an der Regulation des humanen AhRR Gens untersucht. Wie sich durch den Einsatz der Deletionskonstrukte herausstellte, ist die putative GC Box-1 offensichtlich nicht aktiv (Abb. 10). Die GC Box-1-enthaltenden Deletionskonstrukte zeigten im Vergleich zu dem *pAhRR* Plasmid deutlich verringerte basale und induzierbare Aktivitäten auf (Abb. 10).

Die putative GC Box-2 befindet sich in direkter Nachbarschaft (8bp 5'-aufwärts) zu dem funktionellen XRE-3-Motiv (Abb. 8). Um die regulatorische Relevanz dieser GC Box zu untersuchen wurden Studien mit der DNA-bindenden Chemikalie Mithramycin A (MitA) durchgeführt. MitA bindet spezifisch an GC-reiche DNA-Abschnitte und blockiert auf diese Weise GC Box- und BTE (*basic transcription element*)-abhängige Prozesse, die von den Zink-Finger-enthaltenden Transkriptionsfaktoren der Sp1/Sp3-Familie gesteuert werden (Blume et al., 1991; Philipsen & Suske, 1999). Diese Gruppe von Transkriptionsfaktoren sind wichtiger Bestandteil der eukaryotischen Transkriptionsmaschinerie und als solches in die Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung involviert (Black et al., 2001; Kaczynski et al., 2003; Safe & Abdelrahim, 2005). Neben den Sp-Molekülen gehören die BTE-bindenden Proteine (BTEB) sowie die Krüppel-ähnlichen Faktoren (KLF) dieser Protein-Familie an (Suske, 1999; Kaczynski et al., 2003).

Durch die Behandlung der Zellen mit MitA und nachfolgenden Reporter-Gen Analysen mit dem *pAhRR-Δ5* Vektor konnte gezeigt werden, dass die Aktivitäten der GC Box sowohl mit der konstitutiven als auch der XRE-getriebenen Luziferase-Expression interferiert (Abb. 13). Diese Ergebnisse implizieren eine kooperative Funktion von GC Box-abhängigen Faktoren und dem AhR/ARNT-Komplex. Durch qRT-PCR-Untersuchungen in MitA-behandelten HeLa Zellen konnten die Reporter-Gen Befunde bestätigt werden (Abb. 14). Die Behandlung mit MitA führte bereits nach 3h zu einer Reduktion der AhRR mRNA Konzentration um 50% (Abb. 14A). Dieser Wert spricht für einen schnellen Umsatz der AhRR mRNA in HeLa Zellen und liegt im Größenbereich der mit Hilfe der Actinomycin D-Methode ermittelten Halbwertszeit der AhRR mRNA von ca. 3h (Bothe, 2006). Zeitlich parallel zur Abnahme der AhRR Kopienzahl wurde auch die konstitutive Genexpression von c-Myc, einem Sp1-abhängigen Proto-Onkogen, reduziert (Abb. 14B) (Snyder et al., 1991). Die MitA-verursachte Reduktion der AhRR Transkription wurde von einem moderaten Anstieg der CYP1A1 mRNA begleitet (Abb. 14C). Dieser Effekt konnte durch eine zusätzliche Stimulation der AhR-Signalkaskade mit 3-MC verstärkt werden (Abb. 15B). Die Daten der Reporter-Gen- und qRT-PCR-Analysen der MitA-behandelten Zelllinien deuten darauf hin, dass die GC Box an Position +17.486 des humanen AhRR Gens regulatorische Aktivitäten besitzt, die sowohl die basale als auch die induzierbare Genexpression beeinflussen können. Hinzu kommt, dass die unmittelbare Nachbarschaft von GC Box und XRE-3 eine direkte Interaktion zwischen GC Box-bindenden Faktoren und dem AhR/ARNT-Dimer begünstigen kann. Eine derartige Interaktion zwischen dem AhR/ARNT-Komplex und Sp1 wurde für die transkriptionelle Aktivierung der humanen CYP1A1 und CYP1B1 Gene beobachtet (Kobayashi et al., 1996; Tsuchiya et al., 2003b). Hierbei stellte sich heraus, dass die HLH/PAS-Domänen des AhR/ARNT-Dimers mit den Zink-Finger-Motiven des Sp1-Moleküls interagieren (Kobayashi et al., 1996). Eine Protein-Protein-Interaktion zwischen AhR und Sp1 konnte auch im Promotor des Cathepsin D Gens beobachtet werden (Wang et al., 1999).

Der Versuch, die Expression von Sp1 mittels RNA Interferenz zu inhibieren und den daraus resultierenden Effekt auf die AhRR Transkription zu analysieren, ist in Abbildung 16 dargestellt. Mit den gewählten siRNA Fragmenten gelang es nicht, die Sp1 mRNA um mehr als 40% bis 50% zu reduzieren (Abb. 16A). Diese Modulation der Sp1 Transkription hatte keinen signifikanten Einfluss auf die AhRR Genexpression (Abb. 16B). Dieses Ergebnis kann bedeuten, dass a) Sp1 nicht das dominante Molekül in der Regulation der AhRR Expression

ist, oder b) die erreichte Reduktion des Sp1 mRNA-Spiegels nicht ausreichte um die regulatorischen Funktionen des Sp1-Moleküls zu unterbinden.

Die durch Zink-Finger-Proteine mediierte Genregulation ist ein komplexer Prozess der aus einem Zusammenspiel von Sp1-verwandten Transkriptionsfaktoren, die sowohl aktivierend als auch inhibierend wirken können, beeinflusst wird (Lomberk & Urrutia, 2005). So konnte gezeigt werden, dass einige Mitglieder der Sp1-Familie wie BTEB-3, BTEB-4 und GKLf (*gut-enriched* KLF) einen repressiven Einfluss auf die Genexpression von CYP1A1 haben und somit Gegenspieler der aktivierend-wirkenden Vertreter der Sp-Moleküle darstellen (Imataka et al., 1992; Zhang et al., 1998; Kaczynski et al., 2001; Kaczynski et al., 2002). Eine durch MitA bewirkte Inhibierung repressiv-agierender Sp-ähnlicher Moleküle könnte somit eine Erklärung für den beobachteten Anstieg der CYP1A1 Expression mit fortschreitender MitA-Behandlung sein (Abb. 14). Dieser beobachtete Anstieg der CYP1A1 mRNA kann auch in der Interferenz der DNA-bindenden Chemikalie mit der GC Box des AhRR Gens und der damit verbundenen reduzierten AhRR Synthese begründet sein.

Einfluss der aktivierten Hypoxie-Signalkaskade auf die Genexpression des humanen AhRR

Aus der Literatur ist bekannt, dass der Hypoxie-Signalweg mit der AhR-Signalkaskade interagieren kann. So wird sowohl die konstitutive als auch die induzierbare Expression von AhR-Zielgenen unter hypoxischen Bedingungen unterdrückt (Gassmann et al., 1997; Chan et al., 1999; Kim & Sheen, 2000; Nie et al., 2001). Es sollte untersucht werden, ob die aktivierte Hypoxie-Signalkaskade einen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation des humanen AhRR Gens hat.

In Übereinstimmung mit der Literatur resultierte die Behandlung von HepG2 Zellen mit dem Hypoxie-stimulierenden Agenz DFX in einer verstärkten Expression des Hypoxie-sensitiven VEGF Gens (Abb. 17C) (Nickols et al., 2007). Zeitlich parallel zur Aktivierung der VEGF-Expression konnte eine Herabregulierung der konstitutiven CYP1A1 mRNA Expression beobachtet werden (Abb. 17B). Als Ursache der CYP1A1 Repression durch Hypoxie wurde in der Literatur kontrovers über eine mögliche Kompetition von HIF-1 α und AhR um den gemeinsamen Bindungspartner ARNT diskutiert (Gradin et al., 1996; Park, 1999; Pollenz et al., 1999; Hofer et al., 2004; Prash et al., 2004). Dieser Erklärungsansatz konnte durch die

Beobachtung einer Hypoxie-vermittelten Hemmung der AhR-induzierten CYP1A1 Expression in HIF-1 α -defizienten Zellen ausgeschlossen werden (Davidson et al., 2003; Allen et al., 2005), so dass der zugrunde liegende molekulare Mechanismus dieser Interaktion bisher nicht verstanden ist. Interessanterweise führte die Behandlung der HepG2 Zellen mit DFX zu einer biphasischen Regulation des AhR-Zielgens AhRR. In einer initialen Phase wurde die AhRR Expression reprimiert, zu späteren Zeitpunkten der Untersuchung jedoch etwa dreifach induziert (Abb. 17A).

Die nachfolgenden Reporter-Gen Analysen mit dem generierten *pAhRR* Plasmid resultierten in einer vier- bis fünffachen Induktion der Luc-Aktivitäten nach DFX-Behandlung (Abb. 18). Diese DFX-mediierte Steigerung der Luc-Aktivitäten wurde in Transfektionsexperimenten mit dem Deletionskonstrukt *pAhRR-Δ5* wieder gefunden (Abb. 18). Diese Tatsache spricht für die Existenz einer regulatorischen, DFX-sensitiven Transkriptionsfaktor-Bindestelle innerhalb der inserierten DNA-Sequenz. In der beschriebenen Datenbank-gestützten Suche nach putativen regulatorischen DNA-Elementen (Abschnitt 3.2), wurden keine potentiellen HRE-Motive entdeckt, die eine direkte Aktivierung des AhRR Gens durch das Hypoxie- bzw. DFX-aktivierte HIF-1 α /ARNT-Dimer erklären würden. Allerdings konnte eine putative Bindestelle für den Transkriptionsfaktor NF- κ B gefunden werden. Dieser Transkriptionsfaktor wird durch verschiedenste Arten von zellulärem Stress aktiviert und ist an der Regulation zahlreicher pro-entzündlicher und anti-apoptotischer Gene beteiligt. NF- κ B stellt somit eine zentrale Schaltstelle in vielen Erkrankungen wie Krebs, Rheuma oder Asthma dar (Pahl, 1999; Delhalle et al., 2004; Karin, 2006). Interessanterweise wurde in der Promotor-Region des murinen AhRR Gens ein NF- κ B-Bindemotiv lokalisiert, welches sich in nachfolgenden Reporter-Gen Studien mit einem NF- κ B-Induktor, dem Phorbol-ester 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA), als funktionell herausstellte (Baba et al., 2001). Um eine mögliche Beteiligung von NF- κ B an der Regulation des humanen AhRR Gens zu untersuchen wurden HepG2 Zellen mit DFX und dem spezifischen NF- κ B-Inhibitor SN50 behandelt. Die nachfolgende Analyse der AhRR mRNA zeigte eine signifikante Hemmung der DFX-induzierten AhRR Expression in Anwesenheit des SN50 Peptids (ab 18h; Abb. 19A). Dieses Ergebnis spricht für eine transkriptionelle Regulation des AhRR durch den aktivierten NF- κ B Transkriptionsfaktor.

Es ist beschrieben, dass der zelluläre Streßmediator NF- κ B sowohl durch Hypoxie (Figueroa et al., 2002; Kunz & Ibrahim, 2003) als auch durch Exposition mit dem Hypoxie-simulierenden Eisenchelator DFX (Jimenez et al., 2000; Jeong et al., 2003; Seo et al., 2003) aktiviert wird. Im Vergleich zu den DFX-behandelten Proben zeigten die mit DFX/SN50-belasteten Zellen eine signifikante Hemmung der DFX-induzierten VEGF Expression (Abb. 19D). Dieser Befund deutet auf eine Beteiligung von NF- κ B in der Regulation der VEGF Transkription in HepG2 Zellen hin. Dieser Zusammenhang ist bereits in anderen Zellsystemen beobachtet worden (Sasaki et al., 2000; Shibata et al., 2002). Die Expression des HIF-1 α Gens wurde weder durch DFX alleine noch durch eine kombinierte Belastung mit DFX und SN50 beeinflusst (Abb. 19E). Dieser Befund stimmt mit vorangegangenen Studien überein die zeigten, dass die HIF-1 α -Transkription auch unter hypoxischen Bedingungen nicht moduliert wird (Huang et al., 1996; Kallio et al., 1997). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass SN50 direkt die Expression des HIF-1 α -Gens blockiert und es somit zur beobachteten verminderten Expression des Hypoxie-Markergens VEGF (oder des AhRR) kommt.

Die durch DFX verursachte Herabregulation der CYP1A1 und CYP1A2 mRNAs in HepG2 Zellen wurde durch die Behandlung mit dem NF- κ B-Inhibitor nicht beeinflusst (Abb. 19B & C). Dieses Ergebnis widerspricht einem Erklärungsansatz von Fradette und du Soich zur Hypoxie-mediierten Hemmung der CYP1A Expression (Fradette & du Souich, 2004). Die Autoren postulieren, dass ein durch Hypoxie verursachter Anstieg der intrazellulären H₂O₂-Produktion zur Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs führt und dieser die Suppression der CYP1A Genexpression bewirkt. Ein ähnlicher Mechanismus wurde für die Zytokin-induzierte Aktivierung von NF- κ B beschrieben (Tian et al., 1999). Die durch Co-Aktivatoren des AhR (p300/CBP) vermittelte Histon Acetylierung im Bereich der CYP1A1 TATA-Box wird durch den aktivierten NF- κ B-Komplex verhindert, wodurch es zu einer Hemmung der CYP1A1 Expression kommt (Ke et al., 2001). Die beobachtete Repression der CYP1A mRNA findet zeitlich gesehen deutlich vor der Induktion des AhRR statt, was eine Suppression der CYP1A Expression durch den AhRR ausschließt (Abb. 19A & B). Eine mögliche Ursache für die Hypoxie-/DFX-induzierte Hemmung der CYP1A Expression könnte das Aktivator Protein-1 (AP-1) sein. So wurde gezeigt, dass die unter Hypoxie notierte Reduktion der AhR-unabhängigen CYP2J2 Expression von diesem Transkriptionsfaktor vermittelt wird (Marden et al., 2003).

4.3 Untersuchungen zur molekularen Funktion des humanen AhRR

Der AhRR ist als AhR-kontrollierter Inhibitor der CYP1A1 Genexpression beschrieben worden (Mimura et al., 1999). Die in Abschnitt 3.1 beschriebene zeitgleiche Induktion der CYP1A1 und AhRR Expression in HepG2 Zellen spricht gegen diese postulierte Funktion des AhRR. Durch unterschiedlich lange Belastungen von HepG2 Zellen mit dem AhR-Liganden 3-MC wurde dieser Befund bestärkt. Wie unter Abschnitt 3.7 gezeigt, kam es bereits nach 40min zu einem signifikanten Anstieg der CYP1A1 Transkription. Die Genexpression des AhRR stieg verzögert, etwa nach 2h der Belastung, an. Die nach 48h notierte, fast 30-fache Induktion des AhRR ging zeitlich parallel mit einem 260-fachen Anstieg des CYP1A1 mRNA Spiegels einher (Abb. 20). Dieser Befund wird durch die Literatur bestätigt (Tsuchiya et al., 2003a). Der Anstieg des postulierten, negativen Rückkopplers der AhR-vermittelten Genexpression hat folglich keinen hemmenden Einfluss auf die fortwährende Induzierbarkeit der CYP1A1 mRNA in HepG2 Zellen. Somit konnte kein AhRR-vermittelter negativer Rückkopplungsmechanismus in der Leberkarzinomzelllinie nachgewiesen werden. Die in den primären Fibroblasten und HeLa Zellen beobachtete Korrelation zwischen einer hohen konstitutiven AhRR Transkription und der fehlenden Responsivität von CYP1A1 gegenüber AhR-Agonisten sprechen für eine konstitutive Aktivität des AhRR Proteins (Abb. 5 & 6). Durch die Hemmung der AhRR mRNA Expression in HeLa Zellen mittels RNA Interferenz und dem daraus resultierenden fünffachen Anstieg der CYP1A1 Expressionsrate (Abb. 21) konnte die reprimierende Funktion des basalen AhRR Gehalts in dieser Zelllinie bewiesen werden.

Hinweise auf den molekularen Mechanismus dieser konstitutiven Aktivitäten des AhRR Moleküls wurden aus den in primären Fibroblasten (Abb. 22) und HeLa Zellen (Abb. 23) durchgeführten ChIP-Analysen gewonnen. In unbehandelten Fibroblasten wurde eine starke Bindung des AhRR Proteins an die XRE-Motive des CYP1A1 Gens beobachtet. Die Behandlung der Zellen mit B(a)P beeinflusste die Stärke der AhRR/XRE-Bindung nicht, wodurch die fehlende Responsivität des CYP1A1 Gens erklärt wird. Die Behandlung der Fibroblasten mit dem HDAC-Inhibitor NaB führte zu einer deutlichen Abschwächung der AhRR/XRE-Assoziation. Dieser Effekt wurde durch eine kombinierte Belastung mit B(a)P und NaB verstärkt. Diese Belastung führte zu einer beinahe vollständigen Dislokation des AhRR von den XREs des CYP1A1 Promotors. Die ChIP-Untersuchungen in HeLa Zellen belegten diesen Befund. Die in den unbehandelten Zellen notierte starke XRE-Bindung des

AhRR wurde durch Zugabe des HDAC-Inhibitors vollständig aufgehoben (Abb. 23). Die Ergebnisse der ChIP-Analysen sprechen für die These, dass ein hoher konstitutiver AhRR Gehalt die Induzierbarkeit der CYP1A1 mRNA kontrolliert. Die Tatsache, dass die DNA-Bindung des AhRR Proteins NaB-sensitiv ist deutet auf eine Beteiligung von Histon Deacetylasen an der Regulation des CYP1A1 Gens hin. Durch qRT-PCR-Untersuchungen in Fibroblasten und HeLa Zellen konnte dieser Verdacht bestätigt werden (Abb. 24). Bereits durch die alleinige Belastung mit NaB kam es in beiden Zelllinien zu einem signifikanten Anstieg der CYP1A1 mRNA Expression. Die kombinierte Belastung mit NaB und B(a)P führte zu einer 200- bzw. 400-fachen Induktion der CYP1A1 Transkription. Diese Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein. Es wurde gezeigt, dass die CYP1A1 Responsivität in Fibroblasten und HeLa Zellen durch eine Exposition mit HDAC-Inhibitoren wie Trichostatin A (TSA) oder NaB wiederhergestellt werden kann (Gradin et al., 1999; Nakajima et al., 2003). Fasst man die ChIP- und qRT-PCR-Daten zusammen, so sprechen diese eindeutig für eine AhRR-vermittelte Repression der CYP1A1 Transkription in unbehandelten HeLa Zellen und primären Fibroblasten. Die NaB-Daten sprechen weiterhin für eine Beteiligung von HDAC-Aktivitäten. Dieses wurde durch eine Co-IP von HDAC-1 und AhRR erhärtet. Wie in Abbildung 25 ersichtlich, konnte eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen HDAC Isoenzym 1 und dem AhRR nachgewiesen werden (Abb. 25).

Die Frage, warum sich die XRE-Bindung des AhRR Proteins als NaB-sensitiv herausstellt, ist nicht eindeutig zu beantworten. Grund dafür ist, dass der Wirkmechanismus, über den NaB die Aktivitäten von HDAC Molekülen inhibiert, nicht bekannt ist (Davie, 2003). Downes und Mitarbeiter konnten zeigen, dass NaB Einfluss auf die Konformation eines nuklearen HDAC/Co-Repressor-Komplexes ausübt (Downes et al., 2000). Durch die NaB-verursachten Änderungen in der Proteinkonformation kommt es zum Zerfall dieses Multiprotein-Komplexes. Die Auswirkungen von diesem NaB-medierten Effekt auf das genetische Expressionsprofil wurde nicht untersucht. Es ist aber bekannt, dass die strukturelle Integrität solcher Co-Repressor-Komplexe wichtig für die Aufrechterhaltung der Chromatinstruktur und somit bedeutend für die geregelten Abläufe der Genexpression ist (Grozinger & Schreiber, 2002). Auf Grund der in dieser Arbeit erhaltenen Befunde lässt sich die Hypothese aufstellen, dass der XRE-gebundene AhRR Teil eines molekularen Co-Repressor-Komplexes ist. Der AhRR rekrutiert chromatinmodulierende Enzyme wie z.B. HDAC-1, wodurch es zu einer Repression der Genexpression von CYP1A1 kommt. Durch die Behandlung mit NaB kommt es zu Konformationsänderungen in den HDAC-Molekülen oder anderen Komponenten des

Co-Repressor-Komplexes, woraufhin dieser zerfällt und das AhRR Protein von den XRE-Motiven dissoziiert.

Interessanterweise wurde die Existenz eines ähnlichen Co-Repressor-Komplexes am Promotor des CYP1A1 Gens bereits gezeigt (Kaczynski et al., 2001). Das Sp1-verwandte Protein BTEB-3 bindet an die GC Box des Gens und rekrutiert Co-Repressoren wie mSin3A und HDAC-1, wodurch es zu einer Repression der CYP1A1 Transkription kommt. Dieser inhibitorische Komplex konkurriert somit mit dem aktivierenden Sp1 Molekül um die GC Box-Bindung (Kaczynski et al., 2001; Kaczynski et al., 2002). Die Behandlung mit NaB könnte zu der Auflösung eines solchen Co-Repressor-Komplexes führen und somit die Aktivitäten der induzierend-wirkenden Faktoren verstärken, wodurch der in Abbildung 24 beobachtete Anstieg der CYP1A1 mRNA Expression nach alleiniger NaB Exposition erklärbar wäre. Ähnliche Mechanismen der Wirkung von NaB auf die konstitutive Genexpression sind bereits für eine Reihe anderer Gene beschrieben worden (Sowa et al., 1999; Chirakkal et al., 2006; White et al., 2006). Ob der AhRR im Falle des CYP1A1 Gens Teil dieses BTEB-3/Co-Repressor Komplexes ist, wurde im Rahmen dieser Dissertation nicht untersucht. Durch die im Promotor des CYP1A1 Gens gegebene räumliche Nähe zwischen GC Box und XRE-Motiven besteht jedoch diese Möglichkeit.

4.4 Regulation von CYP1A1 und AhRR in der Lungenkarzinomzelllinie A549

Die in dieser Arbeit untersuchten A549 Zellen zeigen einige zellspezifische Charakteristika auf. Der konstitutive AhRR Gehalt der Lungenkarzinomzellen ist, ähnlich dem der HepG2 Zellen, relativ niedrig (Abb. 5A). Im Vergleich zu den HepG2 Zellen führt eine Belastung der A549 Zellen mit AhR-Agonisten jedoch zu einer abgeschwächten Induktionsantwort des CYP1A1 Gens (Abb. 6B). Ein möglicher Grund für die schwache Responsivität der A549 Zellen stellt die beobachtete konstitutive Bindung des AhRR an die XRE-Seiten des CYP1A1 Gens dar (Abb. 26). Diese konnte in den responsiven HepG2 Zellen nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zu den Fibroblasten und HeLa Zellen (Abb. 22 & 23), ist die AhRR/XRE-Bindung in den A549 Zellen offenbar sensitiv gegenüber dem AhR-Liganden B(a)P. Im Widerspruch dazu konnte durch ChIP-Analysen in unbehandelten A549 Zellen jedoch die Präsenz verschiedener HDAC Isoenzyme am CYP1A1 XRE beobachtet werden (Abb. 27).

Besonders für die XRE-Bindung von HDAC-1 und -4 wurden starke Signale notiert. Dieser Befund bestätigt die im vorangegangenen Kapitel aufgestellte These, dass der AhRR durch die Rekrutierung von HDAC Enzymen Einfluss auf die Regulation der CYP1A1 Expression nimmt. Durch die Behandlung der A549 Zellen mit NaB und B(a)P konnte die Induzierbarkeit des CYP1A1 Gens verstärkt werden (Tab. 3). Eine deutlich stärkere Erhöhung der CYP1A1 Antwort wurde nach Belastung der Zellen mit dem DNA-Methylase Hemmer 5'-Aza notiert (Tab. 3). Dieses Ergebnis ist nicht ungewöhnlich, da bekannt ist, dass eine Methylierung von CpG-Inseln häufig mit einer Deacetylierung der umgebenden Histone einhergeht (Nan et al., 1998; Razin, 1998; Ng & Bird, 1999). Das Prozesse der DNA-Methylierung in den A549 Zellen eine funktionelle Bedeutung in der Regulation der CYP1A1 Transkription haben ist bereits in der Literatur beschrieben (Anttila et al., 2003). Auch in anderen Zelllinien, wie den Lungenzellen R9ab des Kaninchens oder den humanen Prostatakarzinomzellen LNCaP, ist ein solcher epigenetischer Mechanismus der CYP1A1 Regulation beobachtet worden (Takahashi et al., 1998; Okino et al., 2006). Warum in den A549 Zellen die alleinige B(a)P-Exposition ausreicht um die in der ChIP-Analyse (Abb. 26) beobachtete Dissoziation des AhRR von den CYP1A1 XREs zu bewirken ist nicht klar. Eine mögliche, wenn auch spekulative Erklärung könnte eine zellspezifische Erhöhung der Aktivitäten von AhR Co-Aktivatoren sein. Es ist bekannt, dass der DNA-gebundene AhR Histon Acetylasen wie p300, CBP oder SRC-1 rekrutiert (Beischlag et al., 2002; Hestermann & Brown, 2003). Eine möglicherweise erhöhte Aktivität dieser Co-Aktivatoren könnte die Abschwächung der AhRR/XRE-Bindung und den gleichzeitigen Anstieg der CYP1A1 mRNA erklären.

Da die Expression der AhRR mRNA in den A549 Zellen nicht durch B(a)P induzierbar ist (Abb. 6A), wurde auch hier der Einfluss von 5'-Aza und NaB auf die AhRR Transkription untersucht. Wie in Tabelle 3 aufgezeigt, hatte die Behandlung der A549 Zellen mit 5'-Aza oder NaB alleine keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA Expressionsrate des AhRR. Durch eine kombinierte Belastung mit B(a)P und 5'-Aza wurde ein sechsfacher, durch B(a)P und NaB Behandlung ein zehnfacher Anstieg der AhRR Transkription erreicht. Diese Daten sprechen dafür, dass DNA-Methylierung und/oder Histon Deacetylierung eine Rolle in der Modulation der AhRR Genexpression spielen. Eine vergleichende Bisulfit-Sequenzierung eines XRE-enthaltenden Promotorabschnittes des humanen AhRR Gens in A549 und den responsiven HepG2 Zellen führte zum gleichen Ergebnis. Das durch die Datenbank *MethPrimer* vorhergesagte DNA-Methylierungsmuster wurde in beiden Zelllinien wieder

gefunden (Abb. 28). Die gefundene DNA-Methylierung innerhalb der Kernsequenz des XRE spricht dafür, dass dieses im Luc-Assay responsive XRE (*pAhRR-3*, Abb. 9) für die Regulation der AhRR Expression in HepG2 und A549 Zellen nicht von funktioneller Bedeutung ist. Eine DNA-Methylierung in dem untersuchten Genabschnitt kann folglich nicht die Ursache für die unterschiedliche Responsivität des AhRR Gens in den A549 und HepG2 Zellen sein. Vermutlich ist die DNA-Methylierung in anderen regulatorischen Bereichen des humanen AhRR Gens für die beobachteten unterschiedlichen Induzierbarkeiten verantwortlich.

4.5 Einordnung dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit konnten neue Erkenntnisse über die Mechanismen der transkriptionellen Regulation sowie der molekularen Funktion des humanen AhRR gewonnen werden.

Die in der Literatur publizierten Kenntnisse über die Genregulation des humanen AhRR beschränkten sich auf Datenbank-Analysen und Vergleiche zwischen humanen und murinen Sequenzabschnitten (Baba et al., 2001; Cauchi et al., 2003). In dieser Arbeit konnte ein 1kb langer regulatorischer Bereich des AhRR Intron 1 kloniert werden, der ein responsives XRE-Motiv und eine funktionell aktive GC Box enthält. Die Relevanz des identifizierten XREs konnte durch ChIP-Analysen bestätigt werden, die zeigten, dass AhR und ARNT an dieses DNA-Element binden. Durch den Befund, dass der AhRR an sein eigenes XRE-Motiv bindet, konnte erstmals ein autoregulativer Mechanismus der AhRR Expression aufgezeigt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Hypoxie-simulierende Agenzien wie DFX die Genexpression des AhRR verstärken. Dieser Prozess konnte als NF- κ B-abhängig identifiziert werden. Eine potentiell verantwortliche NF- κ B-Bindestelle konnte in dem klonierten Intron 1 Fragment lokalisiert werden.

Die von Mimura und Kollegen postulierte negative AhRR-medierte Rückkopplung des AhR-Signalwegs konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Mimura et al., 1999; Karchner et al., 2002). Im Hinblick auf die molekulare Funktion konnte gezeigt werden, dass der AhRR in Fibroblasten und HeLa Zellen eine konstitutive Funktion ausübt. In Übereinstimmung mit der Literatur (Gradin et al., 1993; Gradin et al., 1999) konnte bewiesen

werden, dass die hohe basale AhRR Expression die AhR-abhängige Induzierbarkeit des CYP1A1 Gens unterdrückt. Der XRE-gebundene AhRR rekrutiert Co-Repressoren wie HDAC-1 wodurch es zu lokalen Veränderungen der Chromatinstruktur kommt, die mit der Hemmung der CYP1A1 Genexpression einhergehen.

Der in den primären Fibroblasten beobachtete Mechanismus der AhRR-vermittelten Kontrolle der CYP1A1 Transkription kann durchaus von biologischer Relevanz sein. So sind Fibroblasten u.a. für die Synthese der extrazellulären Matrix Komponenten, wie z.B. Kollagen und Fibronectin, verantwortlich. Dadurch bedingt sind diese Zellen essentiell für Prozesse der Wundheilung und die Integrität vieler Gewebe und Organe (Heckmann & Krieg, 1989). Ein hoher basaler AhRR Gehalt kann Teil eines zellulären Schutzmechanismus darstellen, der die CYP1A1 Expression reprimiert und die Fibroblasten so vor toxischen Metaboliten und reaktiven Sauerstoffspezies schützt.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen der transkriptionellen Regulation sowie die intrazellulären Funktionen des humanen AhRR zu erforschen. Für die Untersuchungen standen vier humane Zelllinien zur Verfügung. Neben den drei transformierten Zelllinien A549, HepG2 und HeLa, wurde eine primäre Fibroblasten Kultur in die Studien einbezogen.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende wesentliche Ergebnisse erzielt:

1. Die untersuchten Zelllinien zeigen eine zellspezifische AhRR Genexpression auf. Die Höhe der basalen AhRR Transkription korreliert mit der Responsivität des CYP1A1 Gens gegenüber AhR-Agonisten.
2. Das AhRR Gen wird durch einen regulatorisch aktiven Bereich in der Intron 1 Region moduliert. In diesem Bereich ist ein responsives XRE-Motiv lokalisiert, welches durch AhR und ARNT angesteuert wird. Das AhRR Protein bindet ebenfalls an dieses XRE-Motiv und moduliert somit seine eigene Expression autoregulatorisch.
3. In direkter Nachbarschaft des XREs ist eine funktionelle GC Box lokalisiert. Dieses DNA-Bindemotiv für Sp1-verwandte Transkriptionsfaktoren beeinflusst sowohl die basale als auch die 3-MC-induzierbare AhRR Genexpression.
4. Die Aktivierung der Hypoxie-sensitiven Signalkaskade führt zu einer NF- κ B-vermittelten Induktion der AhRR Transkription. Ein im Intron 1 lokalisiertes NF- κ B-Bindemotiv zeigt DFX- bzw. Hypoxie-responsive Aktivitäten auf.
5. Ein Ausschalten der AhRR Expression in den nicht-responsiven HeLa Zellen geht mit einem Anstieg der basalen CYP1A1 mRNA Expression einher. Der AhRR spielt somit in der konstitutiven Regulation der CYP1A1 Transkription eine funktionelle Rolle.
6. Die fehlende CYP1A1 Responsivität in Fibroblasten und HeLa Zellen wird durch den konstitutiv XRE-gebundenen AhRR verursacht. Dieser rekrutiert HDAC-Moleküle wodurch es zu einer nachgeschalteten Hemmung der CYP1A1 Genexpression kommt.

Die gewonnenen Befunde lassen auf eine komplexe Steuerung der AhRR Transkription schließen und deuten auf mögliche AhR-unabhängige Wege der AhRR-Aktivierung hin. Der AhRR spielt eine Rolle in der konstitutiven Regulation von AhR-Zielgenen und stellt somit vermutlich Teil eines zellulären Schutzmechanismus dar. Die postulierte Funktion des AhRR als negativer Regulator der AhR-Signalkaskade konnte nicht belegt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Allen JW, Johnson RS, Bhatia SN** (2005) Hypoxic Inhibition of 3-Methylcholanthrene-Induced CYP1A1 Expression Is Independent of HIF-1alpha. *Toxicol Lett* 155:151-159.
- Andersson P, McGuire J, Rubio C, Gradin K, Whitelaw ML, Pettersson S, Hanberg A, Poellinger L** (2002) A Constitutively Active Dioxin/Aryl Hydrocarbon Receptor Induces Stomach Tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9990-9995.
- Antonsson C, Arulampalam V, Whitelaw M, Pettersson S, Poellinger L** (1995) Constitutive Function of the Basic Helix-Loop-Helix Pas Factor Arnt – Regulation of Target Promoters Via the E-Box Motif. *J Biol Chem* 270:13968-13972.
- Anttila S, Hakkola J, Tuominen P, Elovaara E, Husgafvel-Pursiainen K, Karjalainen A, Hirvonen A, Nurminen T** (2003) Methylation of Cytochrome P4501A1 Promoter in the Lung Is Associated With Tobacco Smoking. *Cancer Res* 63:8623-8628.
- Arpiainen S, Raffalli-Mathieu F, Lang MA, Pelkonen O, Hakkola J** (2005) Regulation of the Cyp2a5 Gene Involves an Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Pathway. *Mol Pharmacol* 67:1325-1333.
- Baba T, Mimura J, Gradin K, Kuroiwa A, Watanabe T, Matsuda Y, Inazawa J, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y** (2001) Structure and Expression of the Ah Receptor Repressor Gene. *J Biol Chem* 276:33101-33110.
- Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG** (2001) Aberrant Patterns of DNA Methylation, Chromatin Formation and Gene Expression in Cancer. *Hum Mol Genet* 10:687-692.
- Beischlag TV, Wang S, Rose DW, Torchia J, Reisz-Porszasz S, Muhammad K, Nelson WE, Probst MR, Rosenfeld MG, Hankinson O** (2002) Recruitment of the NCoA/SRC-1/P160 Family of Transcriptional Coactivators by the Aryl Hydrocarbon Receptor/Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Complex. *Mol Cell Biol* 22:4319-4333.
- Bell DR und Poland A** (2000) Binding of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) to AhR-Interacting Protein. The Role of Hsp90. *J Biol Chem* 275:36407-36414.
- Bernshausen T, Jux B, Esser C, Abel J, Fritsche E** (2006) Tissue Distribution and Function of the Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor (AhRR) in C57BL/6 and Aryl Hydrocarbon Receptor Deficient Mice. *Arch Toxicol* 80:206-211.
- Bjeldanes LF, Kim J, Grose KR, Bartholomew JC, Bradfield CA** (1991) Aromatic Hydrocarbon Responsiveness-Receptor Agonists Generated From Indole-3-Carbinol in Vitro and in Vivo: Comparisons With 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9543-9547.
- Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J** (2001) Sp1 and Krüppel-Like Factor Family of Transcription Factors in Cell Growth Regulation and Cancer. *J Cell Physiol* 188:143-160.

- Blume S, Snyder R, Ray R, Thomas S, Koller C, Miller D** (1991) Mithramycin Inhibits SP1 Binding and Selectively Inhibits Transcriptional Activity of the Dihydrofolate Reductase Gene in Vitro and in Vivo. *J Clin Invest* 88:1613-1620.
- Bock KW und Köhle C** (2006) Ah Receptor: Dioxin-Mediated Toxic Responses As Hints to Deregulated Physiologic Functions. *Biochem Pharmacol* 72:393-404.
- Bothe H** (2006) Untersuchung zur Regulation und Funktion des Aryl Hydrocarbon Rezeptor Repressors. Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der HHU Düsseldorf.
- Bradford MM** (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Carver LA und Bradfield CA** (1997) Ligand-Dependent Interaction of the Aryl Hydrocarbon Receptor With a Novel Immunophilin Homolog in Vivo. *J Biol Chem* 272:11452-11456.
- Cauchi S, Stucker I, Cenee S, Kremers P, Beaune P, Massaad-Massade L** (2003) Structure and Polymorphisms of Human Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor (AhRR) Gene in a French Population: Relationship With CYP1A1 Inducibility and Lung Cancer. *Pharmacogenetics* 13:339-347.
- Chan WK, Yao G, Gu YZ, Bradfield CA** (1999) Cross-Talk Between the Aryl Hydrocarbon Receptor and Hypoxia Inducible Factor Signaling Pathways. Demonstration of Competition and Compensation. *J Biol Chem* 274:12115-12123.
- Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium** (2005) Initial Sequence of the Chimpanzee Genome and Comparison With the Human Genome. *Nature* 437:69-87.
- Chirakkal H, Leech SH, Brookes KE, Prais A, Waby JS, Corfe BM** (2006) Upregulation of BAK by Butyrate in the Colon Is Associated With Increased Sp3 Binding. *Oncogene* 25:7192-7200.
- Christman JK** (2002) 5-Azacytidine and 5-Aza-2'-Deoxycytidine As Inhibitors of DNA Methylation: Mechanistic Studies and Their Implications for Cancer Therapy. *Oncogene* 21:5483-5495.
- Ciolino HP, Daschner PJ, Yeh GC** (1998a) Resveratrol Inhibits Transcription of CYP1A1 in Vitro by Preventing Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Cancer Res* 58:5707-5712.
- Ciolino HP, Daschner PJ, Wang T, Yeh G** (1998b) Effect of Curcumin on the Aryl Hydrocarbon Receptor and Cytochrome P450 1A1 in MCF-7 Human Breast Carcinoma Cells. *Biochem Pharmacol* 56:197-206.
- Ciolino HP, Daschner PJ, Yeh G** (1999) Dietary Flavonols Quercetin and Kaempferol Are Ligands of the Aryl Hydrocarbon Receptor That Affect CYP1A1 Transcription Differentially. *Biochem J* 340:715-722.

Ciolino HP, MacDonald CJ, Memon OS, Bass SE, Yeh GC (2006) Sulindac Regulates the Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Expression of Phase 1 Metabolic Enzymes in Vivo and in Vitro. *Carcinogenesis* 27:1586-1592.

Citri Y, Colot H, Jacquier A, Yu Q, Hall J, Baltimore D, Rosbash M (1987) A Family of Unusually Spliced Biologically Active Transcripts Encoded by a Drosophila Clock Gene. *Nature* 326:42-47.

Conney AH, Miller EC, Miller JA (1956) The Metabolism of Methylated Aminoazo Dyes: V. Evidence for Induction of Enzyme Synthesis in the Rat by 3-Methylcholanthrene. *Cancer Res* 16:450-459.

Cox MB und Miller CA, III. (2004) Cooperation of Heat Shock Protein 90 and p23 in Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling. *Cell Stress Chap* 9:4-20.

Crews ST (1998) Control of Cell Lineage-Specific Development and Transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev* 12:607-620.

Crews ST und Fan CM (1999) Remembrance of Things PAS: Regulation of Development by bHLH-PAS Proteins. *Curr Opin Genet Dev* 9:580-587.

Das PM, Ramachandran K, vanWert J, Singal R (2004) Chromatin Immunoprecipitation Assay. *Biotechniques* 37:961-969.

Davarinos NA und Pollenz RS (1999) Aryl Hydrocarbon Receptor Imported into the Nucleus Following Ligand Binding Is Rapidly Degraded Via the Cytosplasmic Proteasome Following Nuclear Export. *J Biol Chem* 274:28708-28715.

Davidson T, Salnikow K, Costa M (2003) Hypoxia Inducible Factor-1 Alpha-Independent Suppression of Aryl Hydrocarbon Receptor-Regulated Genes by Nickel. *Mol Pharmacol* 64:1485-1493.

Davie JR (2003) Inhibition of Histone Deacetylase Activity by Butyrate. *J Nutr* 133:2485S-2493S.

De Ruijter AJM, Van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, Van Kuilenburg ABP (2003) Histone Deacetylases (HDACs): Characterization of the Classical HDAC Family. *Biochem J* 370:737-749.

Dekker J (2003) A Closer Look at Long-Range Chromosomal Interactions. *Trends Biochem Sci* 28:277-280.

Delhalle S, Blasius R, Dicato M, Diederich M (2004) A Beginner's Guide to NF-KappaB Signaling Pathways. *Ann NY Acad Sci* 1030:1-13.

Denis M, Cuthill S, Wikstrom A, Poellinger L, Gustafsson J (1988) Association of the Dioxin Receptor With the Mr 90,000 Heat Shock Protein: a Structural Kinship With the Glucocorticoid Receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 155:801-807.

Denison MS, Fisher JM, Whitlock JP, Jr. (1988) The DNA Recognition Site for the Dioxin-Ah Receptor Complex. Nucleotide Sequence and Functional Analysis. *J Biol Chem* 263:17221-17224.

- Denison MS, Fisher JM, Whitlock JP, Jr.** (1989) Protein-DNA Interactions at Recognition Sites for the Dioxin-Ah Receptor Complex. *J Biol Chem* 264:16478-16482.
- Denison M und Nagy S** (2003) Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:309-334.
- Döhr O, Sinning R, Vogel C, Münzel P, Abel J** (1997) 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* 51:703-710.
- Dolwick KM, Schmidt JV, Carver LA, Swanson HI, Bradfield CA** (1993) Cloning and Expression of a Human Ah Receptor cDNA. *Mol Pharmacol* 44:911-917.
- Downes M, Ordentlich P, Kao HY, Alvarez JGA, Evans RM** (2000) Identification of a Nuclear Domain With Deacetylase Activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10330-10335.
- Duan R, Porter W, Samudio I, Vyhlidal C, Kladd M, Safe S** (1999) Transcriptional Activation of c-Fos Protooncogene by 17beta-Estradiol: Mechanism of Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Inhibition. *Mol Endocrinol* 13:1511-1521.
- Dunlap JC** (1999) Molecular Bases for Circadian Clocks. *Cell* 96:271-290.
- Elferink C** (2003) Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Cell Cycle Control. *Prog Cell Cycle Res* 5:261-267.
- Ema M, Sogawa K, Watanabe N, Chujoh Y, Matsushita N, Gotoh O, Funae Y, Fujii-Kuriyama Y** (1992) cDNA Cloning and Structure of Mouse Putative Ah Receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 184:246-253.
- Ema M, Matsushita N, Sogawa K, Ariyama T, Inazawa J, Nemoto T, Ota M, Oshimura M, Fujii-Kuriyama Y** (1994) Human Arylhydrocarbon Receptor: Functional Expression and Chromosomal Assignment to 7p21. *J Biochem (Tokyo)* 116:845-851.
- Enan E und Matsumura F** (1996) Identification of c-Src As the Integral Component of the Cytosolic Ah Receptor Complex, Transducing the Signal of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) Through the Protein Phosphorylation Pathway. *Biochem Pharmacol* 52:1599-1612.
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ** (2001) *C. Elegans* EGL-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxygenases That Regulate HIF by Prolyl Hydroxylation. *Cell* 107:43-54.
- Evans BR, Karchner SI, Franks DG, Hahn ME** (2005) Duplicate Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor Genes (*Ahrr1* and *Ahrr2*) in the Zebrafish *Danio Rerio*: Structure, Function, Evolution, and AHR-Dependent Regulation in Vivo. *Arch Biochem Biophys* 441:151-167.
- Fetissov SO, Huang P, Zhang Q, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Rannug A, Hokfelt T, Ceccatelli S** (2004) Expression of Hypothalamic Neuropeptides After Acute TCDD Treatment and Distribution of Ah Receptor Repressor. *Regul Pept* 119:113-124.

- Figuroa YG, Chan AK, Ibrahim R, Tang Y, Burow ME, Alam J, Scandurro AB, Beckman BS** (2002) NF-KappaB Plays a Key Role in Hypoxia-Inducible Factor-1-Regulated Erythropoietin Gene Expression. *Exp Hematol* 30:1419-1427.
- Finnström N, Thörn M, Lööf L, Rane A** (2001) Independent Patterns of Cytochrome P₄₅₀ Gene Expression in Liver and Blood in Patients With Suspected Liver Disease. *Eur J Clin Pharmacol* 57:403-409.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC** (1998) Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Fradette C und Du Souich P** (2004) Effect of Hypoxia on Cytochrome P450 Activity and Expression. *Curr Drug Metab* 5:257-271.
- Fritsche E, Cline JE, Nguyen NH, Scanlan TS, Abel J** (2005) Polychlorinated Biphenyls Disturb Differentiation of Normal Human Neural Progenitor Cells: Clue for Involvement of Thyroid Hormone Receptors. *Environ Health Perspect* 113:871-876.
- Fritsche E, Schäfer C, Bernsmann T, Calles C, Bernshausen T, Wurm M, Hajimiragha H, Hübenthal U, Cline JE, Schroeder P, Rannug A, Klotz LO, Fürst P, Hanenberg H, Abel J, Krutmann J** (2007) Lightning Up the UV Response by Identification of the Arylhydrocarbon Receptor as a Cytoplasmatic Target for Ultraviolet B Radiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, in press
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL** (1992) A Genomic Sequencing Protocol That Yields a Positive Display of 5-Methylcytosine Residues in Individual DNA Strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1827-1831.
- Fujita H, Kosaki R, Yoshihashi H, Ogata T, Tomita M, Hasegawa T, Takahashi T, Matsuo N, Kosaki K** (2002) Characterization of the Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor Gene and Association of Its Pro185Ala Polymorphism With Micropenis. *Teratology* 65:10-18.
- Fukunaga BN, Probst MR, Reisz-Porszasz S, Hankinson O** (1995) Identification of Functional Domains of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *J Biol Chem* 270:29270-29278.
- Gassmann M, Kvietikova I, Rolfs A, Wenger RH** (1997) Oxygen- and Dioxin-Regulated Gene Expression in Mouse Hepatoma Cells. *Kidney Int* 51:567-574.
- Gelboin HV** (1980) Benzo[Alpha]Pyrene Metabolism, Activation and Carcinogenesis: Role and Regulation of Mixed-Function Oxidases and Related Enzymes. *Physiol Rev* 60:1107-1166.
- Gerrish K, Cissell MA, Stein R** (2001) The Role of Hepatic Nuclear Factor 1alpha and PDX-1 in Transcriptional Regulation of the Pdx-1 Gene. *J Biol Chem* 276:47775-47784.
- Gonzalez FJ und Fernandez-Salguero P** (1998) The Aryl Hydrocarbon Receptor. Studies Using the AHR-Null Mice. *Drug Metab Dispos* 26:1194-1198.

- Gouedard C, Barouki R, Morel Y** (2004) Dietary Polyphenols Increase Paraoxonase 1 Gene Expression by an Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Mechanism. *Mol Cell Biol* 24:5209-5222.
- Gradin K, Wilhelmsson A, Poellinger L, Berghard A** (1993) Nonresponsiveness of Normal Human Fibroblasts to Dioxin Correlates With the Presence of a Constitutive Xenobiotic Response Element-Binding Factor. *J Biol Chem* 268:4061-4068.
- Gradin K, McGuire J, Wenger RH, Kvietikova I, Whitelaw ML, Toftgard R, Tora L, Gassmann M, Poellinger L** (1996) Functional Interference Between Hypoxia and Dioxin Signal Transduction Pathways: Competition for Recruitment of the Arnt Transcription Factor. *Mol Cell Biol* 16:5221-5231.
- Gradin K, Toftgard R, Poellinger L, Berghard A** (1999) Repression of Dioxin Signal Transduction in Fibroblasts. Identification of a Putative Repressor Associated with Arnt. *J Biol Chem* 274:13511-13518.
- Grozinger CM und Schreiber SL** (2002) Deacetylase Enzymes: Biological Functions and the Use of Small-Molecule Inhibitors. *Chemistry & Biology* 9:3-16.
- Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA** (2000) The PAS Superfamily: Sensors of Environmental and Developmental Signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:519-561.
- Guo S-W** (2006) The Association of Endometriosis Risk and Genetic Polymorphisms Involving Dioxin Detoxification Enzymes: a Systematic Review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 124:134-143.
- Haarmann-Stemmann T und Abel J** (2006) The Arylhydrocarbon Receptor Repressor (AhRR): Structure, Expression, and Function. *Biol Chem* 387:1195-1199.
- Hankinson O** (2005) Role of Coactivators in Transcriptional Activation by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Arch Biochem Biophys* 433:379-386.
- Hasebe Y, Egawa K, Yamazaki Y, Kunimoto S, Hirai Y, Ida Y, Nose K** (2003) Specific Inhibition of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Alpha Activation and of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Production by Flavonoids. *Biol Pharm Bull* 26:1379-1383.
- Hassig CA, Fleischer TC, Billin AN, Schreiber SL, Ayer DE** (1997) Histone Deacetylase Activity Is Required for Full Transcriptional Repression by mSin3A. *Cell* 89:341-347.
- Heath-Pagliuso S, Rogers W, Tullis K, Seidel S, Cenijn P, Brouwer A, Denison M** (1998) Activation of the Ah Receptor by Tryptophan and Tryptophan Metabolites. *Biochemistry* 37:11508-11515.
- Heckmann M und Krieg T** (1989) Biological and Pharmacological Modulations of Fibroblast Functions. *Skin Pharmacol* 2:125-137.
- Hestermann EV und Brown M** (2003) Agonist and Chemopreventative Ligands Induce Differential Transcriptional Cofactor Recruitment by Aryl Hydrocarbon Receptor. *Mol Cell Biol* 23:7920-7925.
- Hickey MM und Simon MC** (2006) Regulation of Angiogenesis by Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors. *Curr Top Dev Biol* 76:217-257.

- Hofer T, Pohjanvirta R, Spielmann P, Viluksela M, Buchmann DP, Wenger RH, Gassmann M** (2004) Simultaneous Exposure of Rats to Dioxin and Carbon Monoxide Reduces the Xenobiotic but Not the Hypoxic Response. *Biol Chem* 385:291-294.
- Hoffer A, Chang C, Puga A** (1996) Dioxin Induces Transcription of Fos and Jun Genes by Ah Receptor-Dependent and -Independent Pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 141:238-247.
- Hoffman E, Reyes H, Chu F, Sander F, Conley L, Brooks B, Hankinson O** (1991) Cloning of a Factor Required for Activity of the Ah (Dioxin) Receptor. *Science* 252:954-958.
- Hord NG und Perdeu GH** (1994) Physicochemical and Immunocytochemical Analysis of the Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator: Characterization of Two Monoclonal Antibodies to the Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator. *Mol Pharmacol* 46:618-626.
- Hosoya T, Oda Y, Takahashi S, Morita M, Kawauchi S, Ema M, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y** (2001) Defective Development of Secretory Neurons in the Hypothalamus of Arnt2-Knockout Mice. *Genes Cells* 6:361-374.
- Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF** (1996) Activation of Hypoxia-Inducible Transcription Factor Depends Primarily Upon Redox-Sensitive Stabilization of Its Alpha Subunit. *J Biol Chem* 271:32253-32259.
- Huang P, Ceccatelli S, Hoegberg P, Sten Shi T-J, Hakansson H, Rannug A** (2003) TCDD-Induced Expression of Ah Receptor Responsive Genes in the Pituitary and Brain of Cellular Retinol-Binding Protein (CRBP-I) Knockout Mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 192:262-274.
- Hukkanen J, Lassila A, Paivarinta K, Valanne S, Sarpo S, Hakkola J, Pelkonen O, Raunio H** (2000) Induction and Regulation of Xenobiotic-Metabolizing Cytochrome P450s in the Human A549 Lung Adenocarcinoma Cell Line. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:360-366.
- Hutvagner G** (2005) Small RNA Asymmetry in RNAi: Function in RISC Assembly and Gene Regulation. *FEBS Lett* 579:5850-5857.
- Ihm C, Park J, Kim H, Lee T, Cha D** (2002) Effects of High Glucose on Interleukin-6 Production in Human Mesangial Cells. *J Korean Med Sci* 17:208-212.
- Imataka H, Sogawa K, Yasumoto K, Kikuchi Y, Sasano K, Kobayashi A, Hayami M, Fujii-Kuriyama Y** (1992) Two Regulatory Proteins That Bind to the Basic Transcription Element (BTE), a GC Box Sequence in the Promoter Region of the Rat P-4501A1 Gene. *Embo J* 11:3663-3671.
- Ioannides C und Lewis DF** (2004) Cytochromes P450 in the Bioactivation of Chemicals. *Curr Top Med Chem* 4:1767-1788.
- Iwanari M, Nakajima M, Kizu R, Hayakawa K, Yokoi T** (2002) Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs by Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons in Various Human Tissue-Derived Cells: Chemical-, Cytochrome P450 Isoform-, and Cell-Specific Differences. *Arch Toxicol* 76:287-298.

Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL (1998) Cellular and Developmental Control of O₂ Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha. *Genes Dev* 12:149-162.

Jain S, Dolwick KM, Schmidt JV, Bradfield CA (1994) Potent Transactivation Domains of the Ah Receptor and the Ah Receptor Nuclear Translocator Map to Their Carboxyl Termini. *J Biol Chem* 269:31518-31524.

Jaiswal A (1991) Human NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase (NQO1) Gene Structure and Induction by Dioxin. *Biochemistry* 30:10647-10653.

Jeon MS und Esser C (2000) The Murine IL-2 Promoter Contains Distal Regulatory Elements Responsive to the Ah Receptor, a Member of the Evolutionarily Conserved bHLH-PAS Transcription Factor Family. *J Immunol* 165:6975-6983.

Jeong HJ, Chung HS, Lee BR, Kim SJ, Yoo SJ, Hong SH, Kim HM (2003) Expression of Proinflammatory Cytokines Via HIF-1alpha and NF-KappaB Activation on Desferrioxamine-Stimulated HMC-1 Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 306:805-811.

Jimenez LA, Thompson J, Brown DA, Rahman I, Antonicelli F, Duffin R, Drost EM, Hay RT, Donaldson K, MacNee W (2000) Activation of NF-KappaB by PM(10) Occurs Via an Iron-Mediated Mechanism in the Absence of IkappaB Degradation. *Toxicol Appl Pharmacol* 166:101-110.

Jinno A, Maruyama Y, Ishizuka M, Kazusaka A, Nakamura A, Fujita S (2006) Induction of Cytochrome P450-1A by the Equine Estrogen Equilenin, a New Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand. *J Steroid Biochem Mol Biol* 98:48-55.

Jones P und Baylin S (2002) The Fundamental Role of Epigenetic Events in Cancer. *Nat Rev Genet* 3:415-428.

Kaczynski J, Zhang JS, Ellenrieder V, Conley A, Duenes T, Kester H, van der Burg B, Urrutia R (2001) The Sp1-Like Protein BTEB3 Inhibits Transcription Via the Basic Transcription Element Box by Interacting With mSin3A and HDAC-1 Co-Repressors and Competing With Sp1. *J Biol Chem* 276:36749-36756.

Kaczynski J, Conley AA, Fernandez Zapico M, Delgado SM, Zhang JS, Urrutia R (2002) Functional Analysis of Basic Transcription Element (BTE)-Binding Protein (BTEB) 3 and BTEB4, a Novel Sp1-Like Protein, Reveals a Subfamily of Transcriptional Repressors for the BTE Site of the Cytochrome P4501A1 Gene Promoter. *Biochem J* 366:873-882.

Kaczynski J, Cook T, Urrutia R (2003) Sp1-and Kruppel-Like Transcription Factors. *Genome Biol* 4:206.

Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L (1997) Activation of Hypoxia-Inducible Factor 1alpha : Posttranscriptional Regulation and Conformational Change by Recruitment of the Arnt Transcriptionáfactor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5667-5672.

Kanno Y, Takane Y, Izawa T, Nakahama T, Inouye Y (2006) The Inhibitory Effect of Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor (AhRR) on the Growth of Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *Biol Pharm Bull* 29:1254-1257.

- Karchner SI, Franks DG, Powell WH, Hahn ME** (2002) Regulatory Interactions Among Three Members of the Vertebrate Aryl Hydrocarbon Receptor Family: AHR Repressor, AHR1, and AHR2. *J Biol Chem* 277:6949-6959.
- Karin M** (2006) Nuclear Factor-kappaB in Cancer Development and Progression. *Nature* 441:431-436.
- Kazlauskas A, Poellinger L, Pongratz I** (1999) Evidence That the Co-Chaperone p23 Regulates Ligand Responsiveness of the Dioxin (Aryl Hydrocarbon) Receptor. *J Biol Chem* 274:13519-13524.
- Kazlauskas A, Poellinger L, Pongratz I** (2000) The Immunophilin-Like Protein XAP2 Regulates Ubiquitination and Subcellular Localization of the Dioxin Receptor. *J Biol Chem* 275:41317-41324.
- Kazlauskas A, Sundstrom S, Poellinger L, Pongratz I** (2001) The Hsp90 Chaperone Complex Regulates Intracellular Localization of the Dioxin Receptor. *Mol Cell Biol* 21:2594-2607.
- Ke S, Rabson AB, Germino JF, Gallo MA, Tian Y** (2001) Mechanism of Suppression of Cytochrome P-450 1A1 Expression by Tumor Necrosis Factor-Alpha and Lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 276:39638-39644.
- Kerkvliet N** (2002) Recent Advances in Understanding the Mechanisms of TCDD Immunotoxicity. *Int Immunopharmacol* 2:277-291.
- Kewley R, Whitelaw M, Chapman-Smith A** (2004) The Mammalian Basic Helix-Loop-Helix/PAS Family of Transcriptional Regulators. *Int J Biochem Cell Biol* 36:189-204.
- Kikuchi Y, Ohsawa S, Mimura J, Ema M, Takasaki C, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y** (2003) Heterodimers of bHLH-PAS Protein Fragments Derived From AhR, AhRR, and Arnt Prepared by Co-Expression in *Escherichia Coli*: Characterization of Their DNA Binding Activity and Preparation of a DNA Complex. *J Biochem (Tokyo)* 134:83-90.
- Kim D, Gazourian L, Quadri S, Romieu-Mourez R, Sherr D, Sonenshein G** (2000) The RelA NF-KappaB Subunit and the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Cooperate to Transactivate the c-Myc Promoter in Mammary Cells. *Oncogene* 19:5498-5506.
- Kim JE und Sheen YY** (2000) Inhibition of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD)-Stimulated Cyp1a1 Promoter Activity by Hypoxic Agents. *Biochem Pharmacol* 59:1549-1556.
- Kleinig H und Sitte P** (1999) Zellbiologie. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm.
- Ko HP, Okino ST, Ma Q, Whitlock JP, Jr.** (1996) Dioxin-Induced CYP1A1 Transcription in Vivo: the Aromatic Hydrocarbon Receptor Mediates Transactivation, Enhancer-Promoter Communication, and Changes in Chromatin Structure. *Mol Cell Biol* 16:430-436.
- Kobayashi A, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y** (1996) Cooperative Interaction Between AhR/Arnt and Sp1 for the Drug-Inducible Expression of CYP1A1 Gene. *J Biol Chem* 271:12310-12316.

Kobayashi A, Numayama-Tsuruta K, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y (1997) CBP/p300 Functions As a Possible Transcriptional Coactivator of Ah Receptor Nuclear Translocator (Arnt). *J Biochem (Tokyo)* 122:703-710.

Köhle C, Gschaidmeier H, Lauth D, Topell S, Zitzer H, Bock K (1999) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin (TCDD)-Mediated Membrane Translocation of C-Src Protein Kinase in Liver WB-F344 Cells. *Arch Toxicol* 73:152-158.

Kohli A (2006) Untersuchungen zur Regulation des Humanen Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressors. Dissertation, Medizinische Fakultät der HHU Düsseldorf.

Kolluri SK, Balduf C, Hofmann M, Göttlicher M (2001) Novel Target Genes of the Ah (Dioxin) Receptor: Transcriptional Induction of N-Myristoyltransferase 2. *Cancer Res* 61:8534-8539.

Korkalainen M, Tuomisto J, Pohjanvirta R (2004) Primary Structure and Inducibility by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin (TCDD) of Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor in a TCDD-Sensitive and a TCDD-Resistant Rat Strain. *Biochem Biophys Res Commun* 315:123-131.

Kress S und Greenlee WF (1997) Cell-Specific Regulation of Human CYP1A1 and CYP1B1 Genes. *Cancer Res* 57:1264-1269.

Kunz M und Ibrahim SM (2003) Molecular Responses to Hypoxia in Tumor Cells. *Mol Cancer* 2:23.

Lahvis GP, Pyzalski RW, Glover E, Pitot HC, McElwee MK, Bradfield CA (2005) The Aryl Hydrocarbon Receptor Is Required for Developmental Closure of the Ductus Venosus in the Neonatal Mouse. *Mol Pharmacol* 67:714-720.

LaPres JJ, Glover E, Dunham EE, Bunger MK, Bradfield CA (2000) ARA9 Modifies Agonist Signaling Through an Increase in Cytosolic Aryl Hydrocarbon Receptor. *J Biol Chem* 275:6153-6159.

Lees MJ, Peet DJ, Whitelaw ML (2003) Defining the Role for XAP2 in Stabilization of the Dioxin Receptor. *J Biol Chem* 278:35878-35888.

Levine SL und Perdew GH (2002) Okadaic Acid Increases ARNT Homodimer Transactivation Potential. *Cell Biol Toxicol* 18:109-120.

Li E (2002) Chromatin Modification and Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. *Nat Rev Genet* 3:662-673.

Lin YZ, Yao S, Veach RA, Torgerson TR, Hawiger J (1995) Inhibition of Nuclear Translocation of Transcription Factor NF- κ B by a Synthetic Peptide Containing a Cell Membrane-Permeable Motif and Nuclear Localization Sequence. *J Biol Chem* 270:14255-14258.

Lindebro M, Poellinger L, Whitelaw M (1995) Protein-Protein Interaction Via PAS Domains - Role of the PAS Domain in Positive and Negative Regulation of the bHLH/PAS Dioxin Receptor-Arnt Transcription Factor Complex. *Embo J* 14:3528-3539.

- Loertscher JA, Lin TM, Peterson RE, Allen-Hoffmann BL** (2002) In Utero Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin Causes Accelerated Terminal Differentiation in Fetal Mouse Skin. *Toxicol Sci* 68:465-472.
- Lomberk G und Urrutia R** (2005) The Family Feud: Turning Off Sp1 by Sp1-Like KLF Proteins. *Biochem J* 392:1-11.
- Lu Y, Santostefano M, Cunnigham B, Threadgill M, Safe S** (1995) Identification of 3'-Methoxy-4'-Nitroflavone As a Pure Aryl Hydrocarbon (Ah) Receptor Antagonist and Evidence for More Than One Form of the Nuclear Ah Receptor in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Arch Biochem Biophys* 316:477.
- Luo G, Gu YZ, Jain S, Chan WK, Carr KM, Hogenesch JB, Bradfield CA** (1997) Molecular Characterization of the Murine Hif-1 Alpha Locus. *Gene Expr* 6:287-299.
- Ma Q und Baldwin KT** (2000) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin-Induced Degradation of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. Role of the Transcriptional Activation and DNA Binding of AhR. *J Biol Chem* 275:8432-8438.
- Ma Q** (2001) Induction of CYP1A1. The AhR/DRE Paradigm: Transcription, Receptor Regulation, and Expanding Biological Roles. *Curr Drug Metab* 2:149-164.
- Ma Q und Baldwin K** (2002) A Cycloheximide-Sensitive Factor Regulates TCDD-Induced Degradation of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Chemosphere* 46:1491-1500.
- Makino Y, Uenishi R, Okamoto K, Isoe T, Hosono O, Tanaka H, Kanopka A, Poellinger L, Haneda M, Morimoto C** (2007) Transcriptional Upregulation of IPAS Gene Expression by HIF-1: A Negative Feedback Regulatory Circuit in HIF-1-Mediated Signaling in Hypoxic Cells. *J Biol Chem* M700732200.
- Maltepe E, Schmidt J, Baunoch D, Bradfield C, Simon M** (1997) Abnormal Angiogenesis and Responses to Glucose and Oxygen Deprivation in Mice Lacking the Protein ARNT. *Nature* 386:403-407.
- Marchand A, Tomkiewicz C, Marchandeanu JP, Boitier E, Barouki R, Garlatti M** (2005) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin Induces Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1 Gene Expression and Counteracts the Negative Effect of Insulin. *Mol Pharmacol* 67:444-452.
- Marden NY, Fiala-Ber E, Xiang SH, Murray M** (2003) Role of Activator Protein-1 in the Down-Regulation of the Human CYP2J2 Gene in Hypoxia. *Biochem J* 373:669-680.
- Marlowe JL und Puga A** (2005) Aryl Hydrocarbon Receptor, Cell Cycle Regulation, Toxicity, and Tumorigenesis. *J Cell Biochem* 96:1174-1184.
- Marmorstein R** (2001) Structure and Function of Histone Acetyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 58:693-703.
- Matikainen T, Perez G, Jurisicova A, Pru J, Schlezinger J, Ryu H, Laine J, Sakai T, Korsmeyer S, Casper R, Sherr D, Tilly J** (2001) Aromatic Hydrocarbon Receptor-Driven Bax Gene Expression Is Required for Premature Ovarian Failure Caused by Biohazardous Environmental Chemicals. *Nat Genet* 28:355-360.

- Matsushita N, Sogawa K, Ema M, Yoshida A, Fujii-Kuriyama Y** (1993) A Factor Binding to the Xenobiotic Responsive Element (XRE) of P-4501A1 Gene Consists of at Least Two Helix-Loop-Helix Proteins, Ah Receptor and Arnt. *J Biol Chem* 268:21002-21006.
- Melcher K** (2004) New Chemical Crosslinking Methods for the Identification of Transient Protein-Protein Interactions With Multiprotein Complexes. *Curr Protein Pept Sci* 5:287-296.
- Miao W, Hu L, Scrivens PJ, Batist G** (2005) Transcriptional Regulation of NF-E2 p45-Related Factor (NRF2) Expression by the Aryl Hydrocarbon Receptor-Xenobiotic Response Element Signaling Pathway: Direct Cross-Talk between Phase I and II Drug-Metabolizing Enzymes. *J Biol Chem* 280:20340-20348.
- Michaud JL, Rosenquist T, May NR, Fan CM** (1998) Development of Neuroendocrine Lineages Requires the bHLH-PAS Transcription Factor SIM1. *Genes Dev* 12:3264-3275.
- Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y** (1999) Identification of a Novel Mechanism of Regulation of Ah (Dioxin) Receptor Function. *Genes Dev* 13:20-25.
- Mimura J und Fujii-Kuriyama Y** (2003) Functional Role of AhR in the Expression of Toxic Effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* 1619:263-268.
- Moennikes O, Loeppen S, Buchmann A, Andersson P, Ittrich C, Poellinger L, Schwarz M** (2004) A Constitutively Active Dioxin/Aryl Hydrocarbon Receptor Promotes Hepatocarcinogenesis in Mice. *Cancer Res* 64:4707-4710.
- Morgan JE und Whitlock JP, Jr.** (1992) Transcription-Dependent and Transcription-Independent Nucleosome Disruption Induced by Dioxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11622-11626.
- Moroianu J** (1999) Nuclear Import and Export Pathways. *J Cell Biochem Suppl* 32-33:76-83.
- Münzel P, Lehmkoetter T, Bruck M, Ritter J, Bock K** (1998) Aryl Hydrocarbon Receptor-Inducible or Constitutive Expression of Human UDP Glucuronosyltransferase UGT1A6. *Arch Biochem Biophys* 350:72-78.
- Murre C, Bain G, van Dijk MA, Engel I, Furnari BA, Massari ME, Matthews JR, Quong MW, Rivera RR, Stuver MH** (1994) Structure and Function of Helix-Loop-Helix Proteins. *Biochim Biophys Acta* 1218:129-135.
- Nagase T, Ishikawa K, Kikuno R, Hirosawa M, Nomura N, Ohara O** (1999) Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. XV. The Complete Sequences of 100 New cDNA Clones From Brain Which Code for Large Proteins in Vitro. *DNA Res* 6:337-345.
- Nakajima M, Iwanari M, Yokoi T** (2003) Effects of Histone Deacetylation and DNA Methylation on the Constitutive and TCDD-Inducible Expressions of the Human CYP1 Family in MCF-7 and HeLa Cells. *Toxicol Lett* 144:247-256.
- Nakata K, Tanaka Y, Nakano T, Adachi T, Tanaka H, Kaminuma T, Ishikawa T** (2006) Nuclear Receptor-Mediated Transcriptional Regulation in Phase I, II, and III Xenobiotic Metabolizing Systems. *Drug Metab Pharmacokinet* 21:437-457.

- Nambu J, Lewis J, Wharton KJ, Crews S** (1991) The *Drosophila Single-Minded* Gene Encodes a Helix-Loop-Helix Protein That Acts As a Master Regulator of CNS Midline Development. *Cell* 67:1157-1167.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A** (1998) Transcriptional Repression by the Methyl-CpG-Binding Protein MeCP2 Involves a Histone Deacetylase Complex. *Nature* 393:386-389.
- Nebert D, Roe A, Dieter M, Solis W, Yang Y, Dalton T** (2000) Role of the Aromatic Hydrocarbon Receptor and [Ah] Gene Battery in the Oxidative Stress Response, Cell Cycle Control, and Apoptosis. *Biochem Pharmacol* 59:65-85.
- Nehls MC, Brenner DA, Gruss HJ, Dierbach H, Mertelsmann R, Herrmann F** (1993) Mithramycin Selectively Inhibits Collagen-Alpha 1(I) Gene Expression in Human Fibroblast. *J Clin Invest* 92:2916-2921.
- Ng HH und Bird A** (1999) DNA Methylation and Chromatin Modification. *Curr Opin Genet Dev* 9:158-163.
- Ng HH und Bird A** (2000) Histone Deacetylases: Silencers for Hire. *Trends Biochem Sci* 25:121-126.
- Nickols NG, Jacobs CS, Farkas ME, Dervan PB** (2007) Improved Nuclear Localization of DNA-Binding Polyamides. *Nucl Acids Res* 35:363-370.
- Nie M, Blankenship AL, Giesy JP** (2001) Interactions Between Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) and Hypoxia Signaling Pathways. *Environ Toxicol Pharmacol* 10:17-27.
- Nishihashi H, Kanno Y, Tomuro K, Nakahama T, Inouye Y** (2006) Primary Structure and Organ-Specific Expression of the Rat Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor Gene. *Biol Pharm Bull* 29:640-647.
- Öberg M, Bergander L, Hakansson H, Rannug U, Rannug A** (2005) Identification of the Tryptophan Photoproduct 6-Formylindolo[3,2-b]Carbazole, in Cell Culture Medium, As a Factor That Controls the Background Aryl Hydrocarbon Receptor Activity. *Toxicol Sci* 85:935-943.
- Okino ST und Whitlock JP, Jr.** (1995) Dioxin Induces Localized, Graded Changes in Chromatin Structure: Implications for Cyp1A1 Gene Transcription. *Mol Cell Biol* 15:3714-3721.
- Okino ST, Pookot D, Li LC, Zhao H, Urakami S, Shiina H, Igawa M, Dahiya R** (2006) Epigenetic Inactivation of the Dioxin-Responsive Cytochrome P4501A1 Gene in Human Prostate Cancer. *Cancer Res* 66:7420-7428.
- Omicinski CJ, Redlich CA, Costa P** (1990) Induction and Developmental Expression of Cytochrome P450IA1 Messenger RNA in Rat and Human Tissues: Detection by the Polymerase Chain Reaction. *Cancer Res* 50:4315-4321.
- Orlando V** (2000) Mapping Chromosomal Proteins in Vivo by Formaldehyde-Crosslinked-Chromatin Immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci* 25:99-104.

- Pahl HL** (1999) Activators and Target Genes of Rel/NF-KappaB Transcription Factors. *Oncogene* 18:6853-6866.
- Park H** (1999) Aromatic Hydrocarbon Nuclear Translocator As a Common Component for the Hypoxia- and Dioxin-Induced Gene Expression. *Mol Cells* 9:172-178.
- Park S, Dong B, Matsumura F** (2007) Rapid Activation of c-Src Kinase by Dioxin Is Mediated by the Cdc37-HSP90 Complex As Part of Ah Receptor Signaling in MCF10A Cells. *Biochemistry* 46:899-908.
- Patel RD, Kim DJ, Peters JM, Perdew GH** (2006) The Aryl Hydrocarbon Receptor Directly Regulates Expression of the Potent Mitogen Epiregulin. *Toxicol Sci* 89:75-82.
- Pelkonen O und Nebert DW** (1982) Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Etiologic Role in Carcinogenesis. *Pharmacol Rev* 34:189-222.
- Perdew GH und Bradfield CA** (1996) Mapping the 90 KDa Heat Shock Protein Binding Region of the Ah Receptor. *Biochem Mol Biol Int* 39:589-593.
- Phelan D, Winter G, Rogers W, Lam J, Denison M** (1998) Activation of the Ah Receptor Signal Transduction Pathway by Bilirubin and Biliverdin. *Arch Biochem Biophys* 357:155-163.
- Philipsen S und Suske G** (1999) A Tale of Three Fingers: the Family of Mammalian Sp/XKLF Transcription Factors. *Nucleic Acids Res* 27:2991-3000.
- Poland A, Glover E, Kende AS** (1976) Stereospecific, High Affinity Binding of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin by Hepatic Cytosol. Evidence That the Binding Species Is Receptor for Induction of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase. *J Biol Chem* 251:4936-4946.
- Pollenz RS, Sattler CA, Poland A** (1994) The Aryl Hydrocarbon Receptor and Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Protein Show Distinct Subcellular Localizations in Hepa 1c1c7 Cells by Immunofluorescence Microscopy. *Mol Pharmacol* 45:428-438.
- Pollenz RS, Davarinos NA, Shearer TP** (1999) Analysis of Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Signaling During Physiological Hypoxia Reveals Lack of Competition for the Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator Transcription Factor. *Mol Pharmacol* 56:1127-1137.
- Pollenz RS und Barbour ER** (2000) Analysis of the Complex Relationship Between Nuclear Export and Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Gene Regulation. *Mol Cell Biol* 20:6095-6104.
- Pongratz I, Mason GG, Poellinger L** (1992) Dual Roles of the 90-KDa Heat Shock Protein Hsp90 in Modulating Functional Activities of the Dioxin Receptor. Evidence That the Dioxin Receptor Functionally Belongs to a Subclass of Nuclear Receptors Which Require Hsp90 Both for Ligand Binding Activity and Repression of Intrinsic DNA Binding Activity. *J Biol Chem* 267:13728-13734.
- Prasch AL, Andreasen EA, Peterson RE, Heideman W** (2004) Interactions Between 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) and Hypoxia Signaling Pathways in Zebrafish: Hypoxia Decreases Responses to TCDD in Zebrafish Embryos. *Toxicol Sci* 78:68-77.

- Probst MR, Reisz-Porszasz S, Agbunag RV, Ong MS, Hankinson O** (1993) Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Protein in Aryl Hydrocarbon (Dioxin) Receptor Action. *Mol Pharmacol* 44:511-518.
- Puga A, Maier A, Medvedovic M** (2000) The Transcriptional Signature of Dioxin in Human Hepatoma HepG2 Cells. *Biochem Pharmacol* 60:1129-1142.
- Puga A, Xia Y, Elferink C** (2002) Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Cell Cycle Regulation. *Chem Biol Interact* 141:117-130.
- Quattrochi LC und Tukey RH** (1993) Nuclear Uptake of the Ah (Dioxin) Receptor in Response to Omeprazole: Transcriptional Activation of the Human CYP1A1 Gene. *Mol Pharmacol* 43:504-508.
- Quattrochi LC, Vu T, Tukey RH** (1994) The Human CYP1A2 Gene and Induction by 3-Methylcholanthrene. A Region of DNA That Supports AH-Receptor Binding and Promoter-Specific Induction. *J Biol Chem* 269:6949-6954.
- Rannug A, Rannug U, Rosenkranz HS, Winqvist L, Westerholm R, Agurell E, Grafstrom AK** (1987) Certain Photooxidized Derivatives of Tryptophan Bind With Very High Affinity to the Ah Receptor and Are Likely to Be Endogenous Signal Substances. *J Biol Chem* 262:15422-15427.
- Rannug A und Fritsche E** (2006) The Aryl Hydrocarbon Receptor and Light. *Biol Chem* 387:1149-1157.
- Razin A** (1998) CpG Methylation, Chromatin Structure and Gene Silencing - a Three-Way Connection. *Embo J* 17:4905-4908.
- Reisz-Porszasz S, Probst MR, Fukunaga BN, Hankinson O** (1994) Identification of Functional Domains of the Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Protein (ARNT). *Mol Cell Biol* 14:6075-6086.
- Reyes H, Reisz-Porszasz S, Hankinson O** (1992) Identification of the Ah Receptor Nuclear Translocator Protein (Arnt) As a Component of the DNA Binding Form of the Ah Receptor. *Science* 256:1193-1195.
- Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A** (2004) Rational siRNA Design for RNA Interference. *Nat Biotechnol* 22:326-330.
- Rhesus Macaque Genome Sequencing and Analysis Consortium** (2007) Evolutionary and Biomedical Insights From the Rhesus Macaque Genome. *Science* 316:222-234.
- Rivera SP, Saarikoski ST, Hankinson O** (2002) Identification of a Novel Dioxin-Inducible Cytochrome P450. *Mol Pharmacol* 61:255-259.
- Roy NK, Courtenay SC, Chambers RC, Wirgin II** (2006) Characterization of the Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor and a Comparison of Its Expression in Atlantic Tomcod From Resistant and Sensitive Populations. *Environ Toxicol Chem* 25:560-571.
- Rushmore TH und Pickett CB** (1990) Transcriptional Regulation of the Rat Glutathione S-Transferase Ya Subunit Gene. Characterization of a Xenobiotic-Responsive Element Controlling Inducible Expression by Phenolic Antioxidants. *J Biol Chem* 265:14648-14653.

- Ryan H, Lo J, Johnson R** (1998) HIF-1 Alpha Is Required for Solid Tumor Formation and Embryonic Vascularization. *Embo J* 17:3005-3015.
- Safe S, Wang F, Porter W, Duan R, McDougal A** (1998) Ah Receptor Agonists As Endocrine Disruptors: Antiestrogenic Activity and Mechanisms. *Toxicol Lett* 102-103:343-347.
- Safe S** (2001) Molecular Biology of the Ah Receptor and Its Role in Carcinogenesis. *Toxicol Lett* 120:1-7.
- Safe S und Abdelrahim M** (2005) Sp Transcription Factor Family and Its Role in Cancer. *Eur J Cancer* 41:2438-2448.
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T** (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory USA.
- Sasaki H, Ray PS, Zhu L, Galang N, Maulik N** (2000) Oxidative Stress Due to Hypoxia/Reoxygenation Induces Angiogenic Factor VEGF in Adult Rat Myocardium: Possible Role of NFkappaB. *Toxicology* 155:27-35.
- Schmidt JV, Carver LA, Bradfield CA** (1993) Molecular Characterization of the Murine Ahr Gene. Organization, Promoter Analysis, and Chromosomal Assignment. *J Biol Chem* 268:22203-22209.
- Schmidt JV, Su GH-T, Reddy JK, Simon MC, Bradfield CA** (1996) Characterization of a Murine Ahr Null Allele: Involvement of the Ah Receptor in Hepatic Growth and Development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6731-6736.
- Schrumpf E** (2002) Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das Molekularbiologische Labor. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Schwarz M, Buchmann A, Stinchcombe S, Kalkuhl A, Bock K** (2000) Ah Receptor Ligands and Tumor Promotion: Survival of Neoplastic Cells. *Toxicol Lett* 112-113:69-77.
- Schwarz M und Appel K** (2005) Carcinogenic Risks of Dioxin: Mechanistic Considerations. *Regul Toxicol Pharmacol* 43:19-34.
- Seidel S, Winter G, Rogers W, Ziccardi M, Li V, Kesser B, Denison M** (2001) Activation of the Ah Receptor Signaling Pathway by Prostaglandins. *J Biochem Mol Toxicol* 15:187-196.
- Selker EU** (1998) Trichostatin A Causes Selective Loss of DNA Methylation in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9430-9435.
- Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE** (1991) Hypoxia-Inducible Nuclear Factors Bind to an Enhancer Element Located 3' to the Human Erythropoietin Gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5680-5684.
- Semenza GL** (1998) Hypoxia-Inducible Factor 1: Master Regulator of O₂ Homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8:588-594.
- Semenza GL** (2000) HIF-1: Mediator of Physiological and Pathophysiological Responses to Hypoxia. *J Appl Physiol* 88:1474-1480.

- Seo SB, Jeong HJ, Chung HS, Lee JD, You YO, Kajiuchi T, Kim HM** (2003) Inhibitory Effect of High Molecular Weight Water-Soluble Chitosan on Hypoxia-Induced Inflammatory Cytokine Production. *Biol Pharm Bull* 26:717-721.
- Shibata A, Nagaya T, Imai T, Funahashi H, Nakao A, Seo H** (2002) Inhibition of NF-KappaB Activity Decreases the VEGF mRNA Expression in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Breast Cancer Res Treat* 73:237-243.
- Snyder RC, Ray R, Blume S, Miller DM** (1991) Mithramycin Blocks Transcriptional Initiation of the C-Myc P1 and P2 Promoters. *Biochemistry* 30:4290-4297.
- Sogawa K, Nakano R, Kobayashi A, Kikuchi Y, Ohe N, Matsushita N, Fujii-Kuriyama Y** (1995) Possible Function of Ah Receptor Nuclear Translocator (Arnt) Homodimer in Transcriptional Regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1936-1940.
- Soneda S, Fukami M, Fujimoto M, Hasegawa T, Koitabashi Y, Ogata T** (2005) Association of Micropenis With Pro185Ala Polymorphism of the Gene for Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor Involved in Dioxin Signaling. *Endocr J* 52:83-88.
- Song J, Clagett-Dame M, Peterson RE, Hahn ME, Westler WM, Sicinski RR, DeLuca HF** (2002) A Ligand for the Aryl Hydrocarbon Receptor Isolated From Lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:14694-14699.
- Sowa Y, Orita T, Minamikawa-Hiranabe S, Mizuno T, Nomura H, Sakai T** (1999) Sp3, but Not Sp1, Mediates the Transcriptional Activation of the P21/WAF1/Cip1 Gene Promoter by Histone Deacetylase Inhibitor. *Cancer Res* 59:4266-4270.
- Suske G** (1999) The Sp-Family of Transcription Factors. *Gene* 238:291-300.
- Swanson HI, Chan WK, Bradfield CA** (1995) DNA Binding Specificities and Pairing Rules of the Ah Receptor, ARNT, and SIM Proteins. *J Biol Chem* 270:26292-26302.
- Swanson HI und Yang JH** (1999) Specificity of DNA Binding of the C-Myc/Max and ARNT/ARNT Dimers at the CACGTG Recognition Site. *Nucleic Acids Res* 27:3205-3212.
- Takahashi Y, Suzuki C, Kamataki T** (1998) Silencing of CYP1A1 Expression in Rabbits by DNA Methylation. *Biochem Biophys Res Commun* 247:383-386.
- Tang YM, Wo YY, Stewart J, Hawkins AL, Griffin CA, Sutter TR, Greenlee WF** (1996) Isolation and Characterization of the Human Cytochrome P450 CYP1B1 Gene. *J Biol Chem* 271:28324-28330.
- Thomsen JS, Kietz S, Strom A, Gustafsson JA** (2004) HES-1, a Novel Target Gene for the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Mol Pharmacol* 65:165-171.
- Tian Y, Ke S, Denison M, Rabson AB, Gallo MA** (1999) Ah Receptor and NF-Kappa B Interactions, a Potential Mechanism for Dioxin Toxicity. *J Biol Chem* 274:510-515.
- Tomita S, Sinal CJ, Yim SH, Gonzalez FJ** (2000) Conditional Disruption of the Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (Arnt) Gene Leads to Loss of Target Gene Induction by the Aryl Hydrocarbon Receptor and Hypoxia-Inducible Factor 1 α . *Mol Endocrinol* 14:1674-1681.

- Tsuchiya M, Katoh M, Motoyama H, Sasaki H, Tsugane S, Ikenoue T** (2005) Analysis of the AhR, ARNT, and AhRR Gene Polymorphisms: Genetic Contribution to Endometriosis Susceptibility and Severity. *Fertil Steril* 84:454-458.
- Tsuchiya Y, Nakajima M, Itoh S, Iwanari M, Yokoi T** (2003a) Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor in Normal Human Tissues and Inducibility by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Human Tumor-Derived Cell Lines. *Toxicol Sci* 72:253-259.
- Tsuchiya Y, Nakajima M, Yokoi T** (2003b) Critical Enhancer Region to Which AhR/ARNT and Sp1 Bind in the Human CYP1B1 Gene. *J Biochem (Tokyo)* 133:583-592.
- Vasiliou V, Reuter S, Williams S, Puga A, Nebert D** (1999) Mouse Cytosolic Class 3 Aldehyde Dehydrogenase (Aldh3a1): Gene Structure and Regulation of Constitutive and Dioxin-Inducible Expression. *Pharmacogenetics* 9:569-580.
- Vogel C, Döhr O, Abel J** (1994) Transforming Growth Factor-Beta 1 Inhibits TCDD-Induced Cytochrome P450IA1 Expression in Human Lung Cancer A549 Cells. *Arch Toxicol* 68:303-307.
- Vogel C, Donat S, Döhr O, Kremer J, Esser C, Roller M, Abel J** (1997) Effect of Subchronic 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin Exposure on Immune System and Target Gene Responses in Mice: Calculation of Benchmark Doses for CYP1A1 and CYP1A2 Related Enzyme Activities. *Arch Toxicol* 71:372-382.
- Wang F, Gao Jx, Mimura J, Kobayashi A, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y** (1998) Structure and Expression of the Mouse AhR Nuclear Translocator (mArnt) Gene. *J Biol Chem* 273:24867-24873.
- Wang F, Wang W, Safe S** (1999) Regulation of Constitutive Gene Expression Through Interactions of Sp1 Protein With the Nuclear Aryl Hydrocarbon Receptor Complex. *Biochemistry* 38:11490-11500.
- Wang F, Shi S, Zhang R, Hankinson O** (2006) Identifying Target Genes of the Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (Arnt) Using DNA Microarray Analysis. *Biol Chem* 387:1215-1218.
- Wang GL und Semenza GL** (1993) Desferrioxamine Induces Erythropoietin Gene Expression and Hypoxia- Inducible Factor 1 DNA-Binding Activity: Implications for Models of Hypoxia Signal Transduction. *Blood* 82:3610-3615.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL** (1995) Hypoxia-Inducible Factor 1 Is a Basic-Helix-Loop-Helix-PAS Heterodimer Regulated by Cellular O₂ Tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5510-5514.
- Wang S und Hankinson O** (2002) Functional Involvement of the Brahma/SWI2-Related Gene 1 Protein in Cytochrome P450IA1 Transcription Mediated by the Aryl Hydrocarbon Receptor Complex. *J Biol Chem* 277:11821-11827.
- Watanabe M, Sueoka K, Sasagawa I, Nakabayashi A, Yoshimura Y, Ogata T** (2004) Association of Male Infertility With Pro185Ala Polymorphism in the Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor Gene: Implication for the Susceptibility to Dioxins. *Fertil Steril* 82:1067-1071.

- Watanabe T, Imoto I, Kosugi Y, Fukuda Y, Mimura J, Fujii Y, Isaka K, Takayama M, Sato A, Inazawa J** (2001) Human Arylhydrocarbon Receptor Repressor (AHRR) Gene: Genomic Structure and Analysis of Polymorphism in Endometriosis. *J Hum Genet* 46:342-346.
- Wenger RH** (2000) Mammalian Oxygen Sensing, Signalling and Gene Regulation. *J Exp Biol* 203:1253-1263.
- White NR, Mulligan P, King PJ, Sanderson IR** (2006) Sodium Butyrate-Mediated Sp3 Acetylation Represses Human Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 Expression in Intestinal Epithelial Cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 42:134-141.
- Whitelaw M, Göttlicher M, Gustafsson J, Poellinger L** (1993) Definition of a Novel Ligand Binding Domain of a Nuclear bHLH Receptor: Co-Localization of Ligand and Hsp90 Binding Activities Within the Regulable Inactivation Domain of the Dioxin Receptor. *Embo J* 12:4169-4179.
- Whitelaw M, Gustafsson J, Poellinger L** (1994) Identification of Transactivation and Repression Functions of the Dioxin Receptor and Its Basic Helix-Loop-Helix/PAS Partner Factor Arnt - Inducible Versus Constitutive Modes of Regulation. *Mol Cell Biol* 14:8343-8355.
- Whitelaw ML, McGuire J, Picard D, Gustafsson J, Poellinger L** (1995) Heat Shock Protein Hsp90 Regulates Dioxin Receptor Function in Vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4437-4441.
- Whitlock JP, Jr.** (1999) Induction of Cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:103-125.
- Wolff S, Harper PA, Wong JMY, Mostert V, Wang Y, Abel J** (2001) Cell-Specific Regulation of Human Aryl Hydrocarbon Receptor Expression by Transforming Growth Factor- β 1. *Mol Pharmacol* 59:716-724.
- Xu C, Li CY, Kong AN** (2005) Induction of Phase I, II and III Drug Metabolism/Transport by Xenobiotics. *Arch Pharm Res* 28:249-268.
- Yamamoto J, Ihara K, Nakayama H, Hikino S, Satoh K, Kubo N, Iida T, Fujii Y, Hara T** (2004) Characteristic Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor Gene in Human Tissues: Organ-Specific Distribution and Variable Induction Patterns in Mononuclear Cells. *Life Sci* 74:1039-1049.
- Yang X, Liu D, Murray TJ, Mitchell GC, Hesterman EV, Karchner SI, Merson RR, Hahn ME, Sherr DH** (2005) The Aryl Hydrocarbon Receptor Constitutively Represses c-Myc Transcription in Human Mammary Tumor Cells. *Oncogene* 24:7869-7881.
- Yueh MF, Huang YH, Hiller A, Chen S, Nguyen N, Tukey RH** (2003) Involvement of the Xenobiotic Response Element (XRE) in Ah Receptor-Mediated Induction of Human UDP-Glucuronosyltransferase 1A1. *J Biol Chem* 278:15001-15006.
- Zhang W, Shields JM, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y, Yang VW** (1998) The Gut-Enriched Krüppel-Like Factor Suppresses the Activity of the CYP1A1 Promoter in an Sp1-Dependent Fashion. *J Biol Chem* 273:17917-17925.

7 Abkürzungsverzeichnis

A/A	Antibiotikum / Antimykotikum
AhR	Arylhydrocarbon Rezeptor
AhRR	AhR Repressor
AIP	AhR-interagierendes Protein
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMV	Avian Myoblastosis Virus
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Aktivator Protein-1
ARNT	AhR Nuklear Translokator
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARA9	AhR-assoziiertes Protein
ATP	Adenosintriphosphat
5'-Aza	5'-Azacytidin
B(a)P	Benzo(a)pyren
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
BTE	basic transcription element
BTEB	BTE bindendes Protein
CAR	Konstitutiver Androstan Rezeptor
C-terminal	Carboxyterminal
CBP	CREB-bindendes Protein
cDNA	copy DNA
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CYP	Cytochrom P450
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFX	Desferrioxamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNMT	DNA Methyltransferase
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-tetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
FCS	Fötales Kälberserum
FP	Forward Primer
HDAC	Histon Deacetylase
HIF-1 α	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 α
HRE	Hypoxie-responsives Element
HRP	Horseradish Peroxidase
hsp90	Hitzeschockprotein 90
IP	Immunpräzipitation
IPAS	Inhibierendes PAS Protein
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
KLF	Krüppel-ähnlicher Faktor
Luc	Luziferase
3-MC	3-Methylcholanthren
β -ME	β -Mercaptoethanol
MeCP	Methyl-CpG-bindendes Protein
MitA	Mithramycin A
MNF	3'-Methoxy-4'-Nitroflavon
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	Boten-RNA
N-terminal	Aminoterminal
NaB	Natrium-Butyrat
NES	Kernexport-Sequenz
NF- κ B	Nuklear Faktor-kappa B
NLS	Kernlokalisations-Sequenz
p.a.	per analysis
PAS	Per-ARNT-Sim
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Per	Period
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PXR	Pregnan X Rezeptor
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RISC	RNA induced silencing complex

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	Reverse Primer
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase /-ion
RT°	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese
Sim	Single-minded
siRNA	silencing RNA
Sp	Specificity Protein
SRC-1	Steroid Rezeptor Coaktivator 1
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
T _m	Schmelztemperatur
TPA	12- <i>O</i> -Tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	Tris-(hydroxymethylmethan)-aminomethan
TSA	Trichostatin A
U	Unit
UVB	Ultraviolett B-Strahlung
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor
Vol.	Volumen
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
XAP2	Hepatitis Virus X-assoziiertes Protein 2
XRE	Xenobiotika-responsives Element

Danksagung

Für die Überlassung des Themas, eine stets angenehme Arbeitsatmosphäre sowie seine fortwährende freundliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Josef Abel.

Herrn Prof. Dr. Frank Wunderlich danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die fakultätsübergreifende Betreuung.

Bei Birgit Neumann möchte ich mich für ihre tatkräftige Unterstützung bedanken, insbesondere bei der Kultivierung der Zellen und den zahlreichen RNA-Isolationen. Danke Bibi!

Bei Dr. Ellen Fritsche, Michaela Moors, Ulrike Hübenthal und allen anderen aktuellen und verflissenen Mitarbeitern der AG Molekulare Toxikologie bedanke ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre und die guten Tipps und Tricks. Der „Repressor-Crew“, Hanno Bothe und Thorsten Bernshausen, danke ich für ihre freundschaftliche Unterstützung, die gute Zusammenarbeit sowie manch lustiges Stündchen in unserem „Schreibklo“. Meinem „Liebelein“ Dr. Ulrich Sydlik ein dickes Dankeschön dafür, dass er mir jederzeit mit Rat und Tat sowie Unmengen von Kaffee und Kuchen zur Seite stand. Außerdem danke ich seiner Frau Caro und ihm für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen Eltern möchte ich von ganzem Herzen für ihre schier endlose Unterstützung, ihre Geduld und ihr Vertrauen in mich bedanken! Vielen Dank, dass ihr mir dies alles ermöglicht habt!

Meiner Großmutter, meiner „Schwiegermutter *in spe*“ Angela Schliefska, sowie Waltraud und Heinz Breidenbroich danke ich herzlich für ihre Unterstützung über all die Jahre hinweg.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Freundin Nathalie für ihren seelischen Beistand, ihre Engelsgeduld und das in mich gesetzte Vertrauen! Vielen Dank, dass Du immer für mich da warst!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst verfasst wurde und dass ich keine anderen als die von mir angegebenen verwendet habe.

(Thomas Haarmann-Stemmann)

Düsseldorf, den 18. Mai 2007