



---

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
Technik und Umwelt

---

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 6381

# **Regulation des Zellzyklus und der MAPK-Kaskaden durch den Ah (Dioxin)- Rezeptor**

**C. Weiß**

Institut für Toxikologie und Genetik

**Oktober 1999**

---



**Forschungszentrum Karlsruhe**  
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte  
FZKA 6381

**Regulation des Zellzyklus und der MAPK-Kaskaden  
durch den Ah (Dioxin) - Rezeptor**

**Carsten Weiß**  
**Institut für Toxikologie und Genetik**

Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der  
Universität Karlsruhe genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe  
1999

**Als Manuskript gedruckt**  
**Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**  
**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH**  
**Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**  
**Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft**  
**Deutscher Forschungszentren (HGF)**  
**ISSN 0947-8620**

# Zusammenfassung

Der AhR spielt eine fundamentale Rolle während der postnatalen Leberentwicklung und vermittelt vor allem die Giftigkeit von Dioxinen. Bisher ist weder ein endogener physiologischer Ligand des AhR identifiziert worden, noch sind die genetischen Programme bekannt, welche die toxischen und physiologischen Wirkungen des AhR vermitteln. Die Aktivierung des Rezeptors durch Dioxine dient deshalb als Sonde zum Auffinden der für Dioxintoxizität relevanten AhR-abhängigen Wirkungen, die vermutlich auch für die physiologische Bedeutung des Rezeptors eine Rolle spielen.

Die Giftigkeit von Dioxinen drückt sich hauptsächlich in der veränderten Differenzierung und Proliferation von Zellen aus. Durch Verwendung eines Zellmodells sollten Signalwege und 'zelluläre Effektor-Moleküle' identifiziert werden, über die Dioxine wie TCDD Toxizität und insbesondere eine Fehlregulation des Zellzyklus bewirken können. Die in dieser Arbeit verwendeten Rattenhepatomzellen (5L-Zellen) werden durch TCDD in ihrer Proliferation besonders deutlich gehemmt. Zunächst sollte die Frage (i) geklärt werden, ob der Ah-Rezeptor die Wirkung von Dioxinen in 5L-Zellen vermittelt. Die proliferationshemmende Wirkung von Dioxinen wurde unter zwei Fragestellungen analysiert, indem untersucht wurde, (ii) welchen Einfluß TCDD auf die grundlegenden regulatorischen Proteine und Kinasen in der G1-S-Progression hat, und (iii) wie TCDD auf die Aktivität von Mitogen-aktivierten Signaltransduktions-Kaskaden sowie die dadurch regulierten Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie wirkt.

In von 5L-Zellen abgeleiteten rezeptordefizienten Varianten BP8<sup>AhR-</sup> führt TCDD zu keiner Proliferationshemmung, die jedoch nach Rekonstitution der AhR-Expression in BP8<sup>AhR+</sup> wieder beobachtet wird. Die biochemische Analyse der AhR-vermittelten TCDD-Wirkungen auf die Zellzyklusmaschinerie ergab, daß der AhR durch die Induktion des Zellzyklusinhibitors *Kip1* die Proliferation hemmt. Die Regulation von *Kip1* durch den AhR erfolgt durch induzierte Transkription und stellt somit einen neuen Induktionsmechanismus von *Kip1* dar. Die AhR-Wirkung auf den *Kip1*-Promotor erfolgt über ein ca. 300bp langes Element, das keine „klassische“ AhR-Erkennungssequenz (XRE) beinhaltet und weicht somit von der bisher bekannten Regulation AhR-abhängiger Zielgene ab. Als weitere neue Zielgene des AhR konnten die vorwiegend durch die Mitogen-aktivierten Signaltransduktions-Kaskaden regulierten Proto-Onkogene *c-Jun* und *c-Fos* identifiziert werden. Der AhR aktiviert über einen von Proteinneusynthese unabhängigen Weg die p38-MAPK. Da weder die bekannten p38-MAPK-Kinasen durch TCDD aktiviert sind noch die Dephosphorylierung der p38-MAPK durch TCDD gehemmt wird, kann die Aktivierung einer bisher unbekanntes p38-MAPK-Kinase durch den AhR postuliert werden.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit drei neue Wirkungsweisen des AhR gezeigt werden - die Regulation der Proto-Onkogene *c-Jun* und *c-Fos*, die induzierte Transkription des Zellzyklusinhibitors *Kip1* sowie die Aktivierung der p38-MAPK. Zumindest eine der hier beschriebenen Wirkungen des AhR, die Induktion von *Kip1*, konnte in der Arbeitsgruppe als Vermittler der Thymustoxizität von Dioxinen identifiziert werden.

# Regulation of the cell cycle and the MAPK cascade by the Ah (Dioxin) receptor

## Abstract

The AhR has a fundamental role during post natal liver development and is essential for mediating dioxin toxicity. So far neither an endogenous physiological ligand has been identified nor are the genetic programs known mediating the toxic and physiological effects of the AhR. Activation of the AhR by dioxins serves as a way to identify relevant AhR-dependent pathways which are responsible for dioxin toxicity. Those pathways may be also involved in the physiological action of the receptor.

Dioxin toxicity results primarily in altered cellular differentiation and proliferation. By using a cell culture model pathways and „cellular effector molecules“ should be identified by which dioxins like TCDD mediate toxicity and in particular dysregulate cell cycle progression. 5L rat hepatoma cells which have been used in this work are severely delayed in cell cycle progression by TCDD. First it should be addressed (i), whether the AhR mediates the effects of dioxins in 5L- cells. The growth inhibitory effects of dioxins were analysed in two ways investigating (ii) which influence TCDD has on the basic regulatory proteins and kinases in G1-S-progression, and (iii) how TCDD acts on the activity of mitogen activated signal transduction cascades and thereby regulated transcription factors of the AP-1-family.

In receptor deficient variant BP8<sup>AhR-</sup>- cells, which have been derived from 5L- cells, TCDD does not effect proliferation. Reconstitution of AhR expression in BP8<sup>AhR-</sup>-cells restores the growth inhibitory effect of TCDD. Biochemical studies of the AhR mediated effects on the basic cell cycle machinery showed, that the AhR inhibits proliferation by inducing the cell cycle inhibitor *Kip1*. Regulation of *Kip1* takes place at the transcriptional level and is a novel mechanism of *Kip1* induction. The action of the AhR on the *Kip1* promoter is mediated by a roughly 300 bp- element which does not contain „classical“ binding sites (XREs) for the receptor. Hence the regulation of *Kip1* is unique and different from the so far known regulation of AhR-dependent target genes.

As additional novel target genes of the AhR the primarily by mitogen activated signal transduction cascades regulated proto oncogenes *c-Jun* and *c-Fos* could be identified. The AhR activates independently of new protein synthesis the p38-MAPK. Since neither known p38-MAPK-kinases are activated nor is the dephosphorylation of p38-MAPK inhibited by TCDD the activation of a yet unknown kinase by the AhR is postulated.

In summary three novel mechanism of AhR-action could have been identified in this work - regulation of the proto oncogenes *c-Jun* and *c-Fos*, induced transcription of the cell cycle inhibitor *Kip1* and activation of p38-MAPK. At least one of the described AhR actions, induction of *Kip1*, could be identified in the group as a mediator of dioxin toxicity in the thymus.

# Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AhR	aromatic hydrocarbon receptor (engl.)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARNT	AhR nuclear translocator (engl.)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
BA	Benz(a)anthrazen
bHLH	basic helix loop helix (engl.)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Celcius
cDNA	copy DNA
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
cpm	Zerfälle pro Minute
CTP	Cytidintri-phosphat
CYP	Cytochrom
dATP	desoxy-ATP
DBD	DNA-Bindedomäne
dest.	destilliert
dNTP	desoxy Nukleotidtri-phosphat
ddNTP	didesoxy Nukleotidtri-phosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dpm	desintegration units per minute (engl.)
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ECL	Enhanced Chemofluorescence
Endkonz.	Endkonzentration

engl.	englisch
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GBq	Gigabequerel
G418	Geneticin <sup>®</sup> -sulphat
Glygly	Glycylglycin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HBS	HEPES gepufferte Salzlösung
HEPES	N- 2- Hydroxyethylpiperazin- N'- 2- ethansulfonsäure
HLH	helix loop helix (engl.)
HSP	Hitzeschockprotein
HSV	Herpes simplex Promotor
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
KAc	Kaliumacetat
KP	Kaliumphosphat
kD	Kilodalton
Luc	Luziferase
M	molar
mA	Milliampere
MBq	Megabequerel
mg	Milligramm
min	Minuten
mind.	mindestens
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mM	millimolar
MOPS	N- Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MT	Metallothionein
NaAc	Natriumacetat
NADPH	Nicotinamid-adenosindinukleotidphosphat (reduziert)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	optische Dichte



PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	plasminogen activator inhibitor
PAS	Period-ARNT-SIM-Homologieregion
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat gepufferete Salzlösung
per	period
Pippi	Phosphatpyrophosphatpuffer
pH	potentium hydrogenium
pmol	pikomol
rel.	relativ
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Raumtemperatur
rRNA	ribosomale RNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunden
sim	single minded
spez.	spezifische
SSC	standard saline citrat (engl.)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBq	Terabequerel
TCDD	Tetrachlordibenzo-p-dioxin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin
TGF	tumor growth factor (engl.)
TK	Thymidinkinase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
tRNA	transfer RNA
u	Einheiten
UDPGT	Uridindiphosphatglucuronyltransferase
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
XRE	xenobiotic responsive element (engl.)
z.B.	zum Beispiel

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Material</b> .....	<b>17</b>
2.1 Bezugsquellen.....	17
2.2 Bakterien und Zellen .....	18
2.3 Kulturmedien.....	19
2.4 Puffer und Lösungen.....	19
2.5 Verwendete Plasmide .....	22
2.6 Oligonukleotide .....	24
2.7 Verwendete Antikörper .....	25
<b>3 Methoden</b> .....	<b>26</b>
3.1 Behandlung von Nucleinsäuren .....	26
Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren .....	26
Phenol/Chloroform-Extraktion.....	26
Konzentration von DNA aus wässrigen Lösungen .....	26
3.2 Präparation von DNA.....	26
Präparation großer Mengen Plasmid-DNA ("Maxipräp").....	26
Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA ("Minipräp") .....	27
3.3 Klonierungstechniken.....	28
Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen.....	28
Ligation von DNA-Fragmenten .....	28
Auffüllen von 5'-Überhängen (Klenow fill in).....	28
3.4 Transformation von Bakterien .....	28

Präparation von kompetenten Bakterien.....	28
Transformationsmethoden.....	29
3.5 Elektrophoretische Auftrennung und Isolierung von DNA .....	29
Auftrennung auf Agarosegelen.....	29
Extraktion von DNA Fragmenten aus Gelen.....	30
3.6 Zellkultur .....	30
Kultivieren und Trypsinieren von Zellen .....	30
Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	31
3.7 Transfektion von Zellen.....	31
3.7.1 Transiente Transfektion.....	31
Elektroporation .....	31
TFX-50(Promega, Mannheim) vermittelte Transfektion .....	31
Behandlung der Zellen mit verschiedenen Substanzen .....	32
3.7.2 Stabile Transfektion.....	32
3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	32
3.9 Enzymtest .....	33
Firefly-Luziferase-Aktivitätsbestimmung .....	33
Messung der Renilla-Luziferase- und der Firefly-Luziferase aus dem selben Zellextrakt.....	33
3.10 Western-Blot.....	33
SDS-PAGE (Laemmli, 1970) .....	33
Western Blot.....	33
Detektion von Protein/Antikörperkomplexen.....	35
Probenherstellung für SDS-PAGE .....	35
Bestimmung des Proteingehalts durch Coomassie-Blau-Färbung .....	35
3.11 RNA-Präparation.....	35
Isolation von Gesamt-RNA.....	35
Poly A <sup>+</sup> -Präparation .....	36
3.11 a Radioaktive Markierung von DNA für die Northern-Blot-Analyse .....	36
3.11 b Northern -Blot-Analyse .....	36

3.12 Messung der Transkriptionsrate durch die "nuclear-run-off"-Analyse .....	37
Immobilisierung von DNA-Fragmenten auf einer Hybond-N+-Membran	
durch die Slot Blot Methode .....	37
"Nuclear-run-off"-Analyse .....	37
3.13 Sequenzierung von Plasmid-DNA .....	38
3.14 DNA-Färbung von eukaryontischen Zellen.....	38
3.15 Messung des DNA-Gehalts pro Zelle mittels der Durchflußzytometrie.....	39
3.16 Gelretardationsanalyse zum Nachweis von DNA-bindenden Proteinen .....	39
Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA mittels der "fill-in"-Methode .....	39
3.17 Immunkomplex-Kinase-Assay zur CDK2-Aktivitätsmessung	
(Matsushime et al.,1994) .....	40
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1 Die stabile Expression des AhR in den rezeptordefizienten</b>	
<b>    BP-8 Zellen rekonstituiert die TCDD-Sensitivität.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2 TCDD Wirkungen auf die Regulation der G1-S-Progression</b>	
<b>    in 5L Zellen.....</b>	<b>44</b>
4.2.1 TCDD-Behandlung hemmt in 5L-Zellen die Phosphorylierung des	
Retinoblastom (Rb)-Proteins .....	44
4.2.2 Die Hemmung der Rb-Phosphorylierung	
durch TCDD ist transkriptionsabhängig.....	46
4.2.3 TCDD hemmt die Zyklin E assoziierte Kinaseaktivität von CDK2.....	47
4.2.4 TCDD verringert weder die Menge von Zyklin D und Zyklin E	
noch die der Kinase CDK2 und CDK4 .....	48
4.2.5 Die Menge an p53-Protein wird durch TCDD nicht erhöht.....	48
4.2.6 TCDD führt zur verstärkten Interaktion von p27 <sup>Kip1</sup>	
mit Zyklin E/CDK2.....	49
4.2.7 Die Regulation von p27Kip1 durch TCDD ist AhR-abhängig .....	51
4.2.8 Der AhR benötigt eine intakte DNA-Bindedomäne	
zur Induktion von p27 <sup>Kip1</sup> .....	51

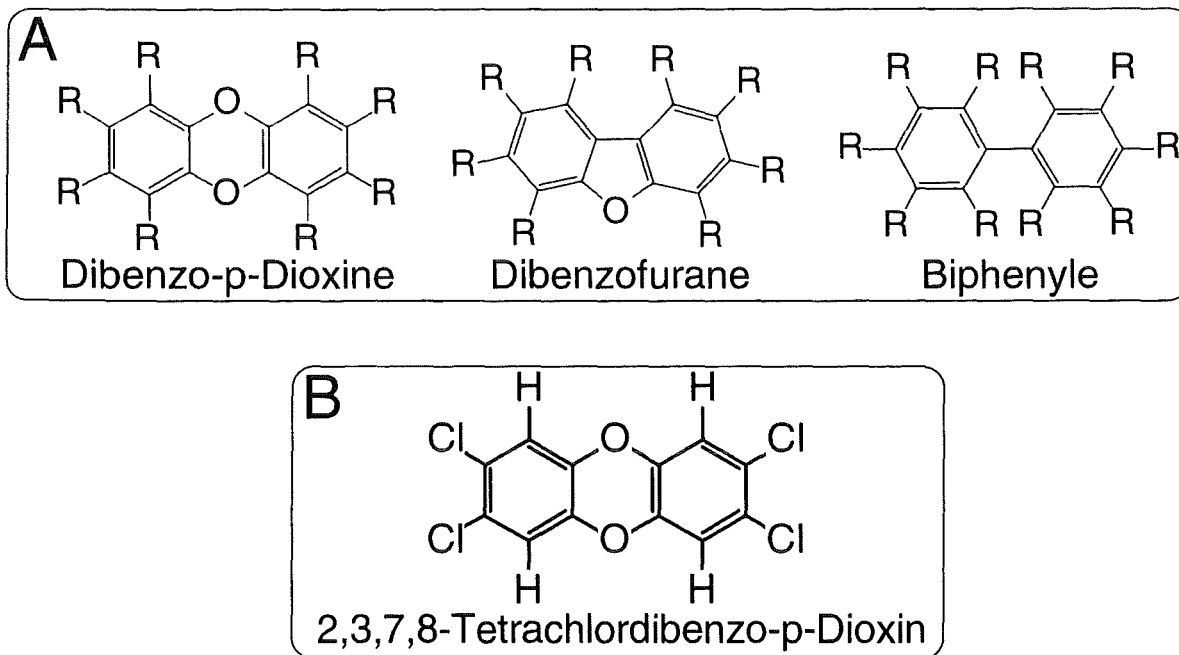
4.2.9 TCDD erhöht die Transkription des <i>Kip1</i> -Gens .....	53
4.2.10 TCDD aktiviert den <i>Kip1</i> -Promotor .....	54
4.2.11 Aktivatoren der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und CREB führen zu keiner Induktion des <i>Kip1</i> -Promotors in 5-L-Zellen .....	57
4.2.12 Ein Inhibitor der c-src-Kinase beeinflußt nicht die p27 <i>Kip1</i> -Induktion durch TCDD .....	58
4.2.13 Eine Region zwischen den Positionen -1609 und -1382 des <i>Kip1</i> -Promotors ist essentiell und ausreichend um TCDD-Induzierbarkeit zu vermitteln .....	59
<b>4.3 Einfluß von TCDD auf die Signaltransduktion zu AP-1 .....</b>	<b>62</b>
4.3.1 TCDD induziert AP-1-Aktivität in 5L-Zellen.....	62
4.3.2 Der AhR vermittelt die AP-1-Aktivierung durch TCDD .....	64
4.3.3 TCDD aktiviert einen Integrator von Signaltransduktions- kaskaden - den <i>c-Fos</i> -Promotor.....	68
4.3.4 Die p38-MAPK wird dauerhaft und AhR-abhängig durch TCDD aktiviert ....	69
4.3.5 TCDD aktiviert die durch die p38-MAPK regulierten Transkriptionsfaktoren CREB, ATF-2 und ELK-1.....	71
4.3.6 Die Aktivierung der p38-MAPK durch TCDD wird nicht durch Wachstumsfaktoren vermittelt.....	74
4.3.7 Der AhR aktiviert die p38-MAPK unabhängig von neuer Proteinsynthese.....	78
4.3.8 Die bisher bekannten p38-MAPK-Kinasen MKK3/6 und SEK werden nicht durch TCDD aktiviert.....	79
4.3.9 Die Dephosphorylierung der p38-MAPK wird nicht durch TCDD gehemmt .....	80
4.3.10 TCDD aktiviert die p38-MAPK auch in primären Thymozyten aus der Maus .....	82

<b>5 Diskussion.....</b>	<b>84</b>
<b>5.1 Mechanismen und Konsequenzen der Dioxinwirkungen in 5L-Zellen .</b>	<b>85</b>
5.1.1 Induktion von p27 <sup>Kip1</sup> und deren Konsequenzen in 5L-Zellen.....	85
5.1.1.1 Wie induziert der AhR p27 <sup>Kip1</sup> ?.....	86
5.1.1.2 Konsequenzen der Kip1-Induktion in 5L-Zellen.....	87
5.1.2 Wie reguliert der AhR die Aktivität der p38-MAPK?.....	88
<b>5.2 Bedeutung der in 5L-Zellen beobachteten Effekte</b>	
<b>für die Dioxintoxizität in vivo .....</b>	<b>89</b>
5.2.1 p27 <sup>Kip1</sup> -Induktion und Dioxintoxizität .....	89
5.2.2 Therapeutische Nutzung der p27 <sup>Kip1</sup> -Induktion durch den AhR.....	91
5.2.3 p38-MAPK und Dioxintoxizität .....	91
5.2.4 Die Regulation vonAP-1 durch den AhR: mögliche Bedeutung für die Giftigkeit von Dioxinen.....	94
<b>5.3 Physiologische Bedeutung des AhR.....</b>	<b>95</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>97</b>

# 1 Einleitung

## Biologische Wirkungen von polyhalogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen

Polyhalogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe wie chlorierte Dibenzo-p-Dioxine (Dioxine) und Dibenzofurane entstehen bei Verbrennungsprozessen (z.B. Müllverbrennung), aber auch als Nebenprodukte bei der industriellen Herstellung von Chlorphenolen, die in zahlreichen Produkten wie Herbiziden, Fungiziden und Pestiziden Verwendung finden (Poland und Knutson, 1982). Dioxine sind ein Gemisch aus insgesamt 75 chemisch verwandten Verbindungen, die sich in der Anzahl und der Positionen der Halogenatome unterscheiden (auch Kongenere genannt). Auf Grund seiner größten biologischen Wirkung wird das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-Dioxin (TCDD) als Modellsubstanz verwendet (van den Heuvel und Lucier, 1993) (Abb.1).



**Abb.1: Chemische Strukturen von Dioxinen.** In Teil A sind die Grundgerüste der Dibenzo-p-Dioxine, der Dibenzofurane und der Biphenyle gezeigt, aus denen durch Einbau von Halogenen Verbindungen mit Dioxin-artigen biologischen Wirkungen entstehen. Die Reste R können entweder für Wasserstoff oder eines der Halogene Fluor, Chlor, Brom oder Iod stehen. Teil B zeigt die chemische Struktur der Modell-Verbindung 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-Dioxin.

Im Tiermodell sind mehrere toxische Wirkungen von Dioxinen beschrieben. Sie sind immuntoxisch und teratogen; sie hemmen die Spermio-genese und sie sind kanzerogen (Couture *et al.*, 1990; van den Heuvel und Lucier, 1993; Peterson, 1993; Huff *et al.*, 1994). Bei Ratten zum Beispiel führen Dioxine zu Karzinomen in der Lunge, der Leber, der Zunge

und zu Hauttumoren (Kociba *et al.*, 1978). Der Mechanismus wie Dioxine hierbei als Kanzerogene wirken ist bisher ungeklärt. Dioxine selbst bilden keine DNA-Addukte und wirken nicht als Mutagene (Turteltaub *et al.*, 1990). Wahrscheinlich fördern Dioxine die Expansion von initiierten Zellen und wirken deshalb als „Tumorpromotoren“. Dioxine wirken schon bei sehr geringen Dosen (bis zu 1 ng/kg Körpergewicht pro Tag) kanzerogen.

Beim Menschen ist die Chlorakne, eine chronische, akneartige Hyperkeratose der Haut, die deutlichste akute toxische Folge von Dioxineinwirkung (Suskind, 1985; Zugerman, 1990). Diese trat nach Unfällen wie beispielsweise in Seveso (Italien, 1976) bei der mit hohen Dioxindosen exponierten Bevölkerung auf. Nachuntersuchungen von Menschen, die als Chemiarbeiter oder bei Unfällen erhöhten Dioxinmengen ausgesetzt waren, legen ebenso eine durch Dioxine verursachte allgemein erhöhte Krebshäufigkeit beim Menschen nahe, die bei seltenen Tumoren, z.B. im Bindegewebe oder im Immunsystem, mit bis zu 9-facher Häufigkeit zum Tode führen. Somit sind hohe Dioxinmengen beim Menschen als kanzerogen einzustufen, auch wenn die genannten Nachuntersuchungen nicht sicher ausschließen können, daß auch andere Chemikalien zum erhöhten Krebsrisiko mit beitragen, da die exponierten Personen zumeist nicht nur Dioxinen sondern komplexen Substanzgemischen ausgesetzt waren.

Die Exposition gegenüber solchen hohen Dosen ist allerdings selten. Welche Dioxinmengen ein Gesundheitsrisiko für den Menschen darstellen, und wie weit und mit welchem Aufwand die allgemeine Dioxinexposition verringert werden muß, läßt sich aus epidemiologischen Studien kaum ableiten. Für eine aussagekräftige epidemiologische Studie fehlt die nicht exponierte Kontrollgruppe, da die mittlere vor allem mit der Nahrung aufgenommene Dioxinmenge in den Industrieländern bereits 100 pg pro Tag (American Chemical Society, 1995) beträgt. Eine Alternative zur epidemiologischen Untersuchung stellt die Klärung des Mechanismus der toxischen Dioxinwirkungen dar, aufgrund dessen dann die bei niedrigen Dosen zu erwartenden Wirkungen abgeschätzt werden könnten.

Im folgenden soll dargestellt werden, was bisher über die molekularen Wirkungen von Dioxinen bekannt ist.

### **Entdeckung eines Rezeptors für aromatische Kohlenwasserstoffe**

Verschiedene Mäusestämme reagieren unterschiedlich sensitiv auf aromatische Kohlenwasserstoffe und Dioxine, was sich beispielsweise in unterschiedlichen Induzierbarkeiten des Cytochrom P450 IA1-Proteins auswirkt (siehe auch nächster Abschnitt). Dies führte zur Beschreibung eines, für aromatische Kohlenwasserstoffe (engl. *aryl hydrocarbons*) sensitiven Mäusestamms (C57BL/6) und eines genetisch davon



unterschiedlichen, weniger sensitiven Mäusestamms (DBA/2). Nach Kreuzung beider Mäusestämme zeigen alle Nachkommen der F1-Generation hohe Sensitivität gegenüber aromatischen Kohlenwasserstoffen (Nebert *et al.*, 1981). Auch in den nächsten Generationen folgt die Weitergabe des Merkmals für die hohe Dioxinsensitivität einem dominant autosomalen Vererbungsgang und führte zur Postulierung eines Ah- (engl. *aryl hydrocarbon responsiveness*) Genlocus. Die Hypothese, daß der Ah-Genlocus für ein Rezeptorprotein kodiert, welches aromatische Kohlenwasserstoffe als Liganden binden kann, wurde mittels radioaktiv markiertem Dioxin ( $^{125}\text{I}$ -Dioxin) überprüft. Durch diese Experimente konnte ein spezifisch markiertes Protein in Leberzellextrakten der empfindlichen Mäuse detektiert werden (Perdew und Poland, 1988). Nach seiner Aufreinigung und Sequenzierung im aminoterminalen Bereich konnte eine Nukleotidfolge für eine degenerierte cDNA Sonde abgeleitet werden. Mit Hilfe dieser Sonde gelang 20 Jahre nach dem ersten Nachweis des Proteins die Isolierung der mRNA, die für das als Dioxinrezeptor (DR) bezeichnete Protein kodiert (Poland *et al.*, 1991; Burbach *et al.*, 1992). Da dieser Rezeptor ebenso andere aromatische Kohlenwasserstoffe (engl. *aryl hydrocarbons*, AH) binden kann, wird er auch als AhR (engl. *Aryl hydrocarbon Receptor*) bezeichnet (Swanson und Bradfield, 1993).

Der AhR ist der Vermittler von Dioxintoxizität. Dies wurde zum einen durch Struktur/Wirkungsbeziehungen nahegelegt, die die Toxizität eines AhR-Liganden mit seiner Bindungsaffinität zum Rezeptor korrelierten. Zum anderen wirkt Dioxin in AhR defizienten Mäusen, sogenannten „AhR-knock-out“-Mäusen, nicht mehr toxisch (Swanson und Bradfield, 1993; Fernandez-Salguero *et al.*, 1996). Welche Gene der AhR reguliert, die zur Toxizität von Dioxinen führen, ist bisher ungeklärt (Swanson und Bradfield, 1993; Göttlicher *et al.*, 1997a).

### **Der AhR wirkt als ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor**

Das bisher am besten untersuchte Aktivität des AhR ist die Induktion der Expression des *Cytochrom P450IA1*-Gens (z.B. in den Mausleberzellen Hepa 1).

Das *Cytochrom P450IA1*-Gen (oder *Cyp1A1*-Gen) gehört zur *P450* Genfamilie, deren Mitglieder für Hämproteine kodieren und als Monooxygenasen zur Metabolisierung von Fettsäuren, Steroidhormonen und Eicosanoiden benötigt werden. Hierbei kommt dem Cyp P450 IA1-Protein eine zentrale Rolle beim Abbau von Fremdstoffen und bei der Bioaktivierung von chemischen Prokarzinogenen zu. Erst durch die Umwandlung von inaktiven Vorstufen in reaktive Metabolite können diese Prokarzinogene beispielsweise DNA-Addukte bilden (Nebert *et al.*, 1993; Nebert, 1994).

Die Klonierung und Sequenzierung des *Cyp 1A1*-Promotors der Maus, der Ratte und des Menschen und die anschließenden Deletionsanalysen des Promotors führten zur

Charakterisierung mehrerer Dioxin-abhängiger Regulationssequenzen (engl. *dioxin responsive elements*, DREs). Diese sind auch das Ziel anderer polyhalogener aromatischer Kohlenwasserstoff- bzw. Fremdstoff- (engl. *xenobiotics*) Wirkungen und werden deshalb auch als XRE-Sequenzen (engl. *xenobiotic responsive elements*) bezeichnet (Swanson und Bradfield, 1993).

Durch DNA-Protein Interaktionsstudien bzw. Promotor-Deletions-Analysen konnte (schon lange bevor die AhR-cDNA kloniert war) gezeigt werden, daß in mit Dioxin behandelten Mäusezellen ein Protein, vermutlich der AhR, spezifisch an die XRE-Sequenzen bindet und als Transkriptionsfaktor wirkt (Fujisawa-Sehara *et al.*, 1987; Denison *et al.*, 1989; Hapgood *et al.*, 1989; Watson und Hankinson, 1992). Durch die spätere Isolierung der für den AhR kodierenden cDNA konnten Antikörper gegen den Rezeptor erzeugt werden (Poland *et al.*, 1991). Diese erkannten und identifizierten das spezifisch an die XRE-Sequenzen bindende Protein als AhR.

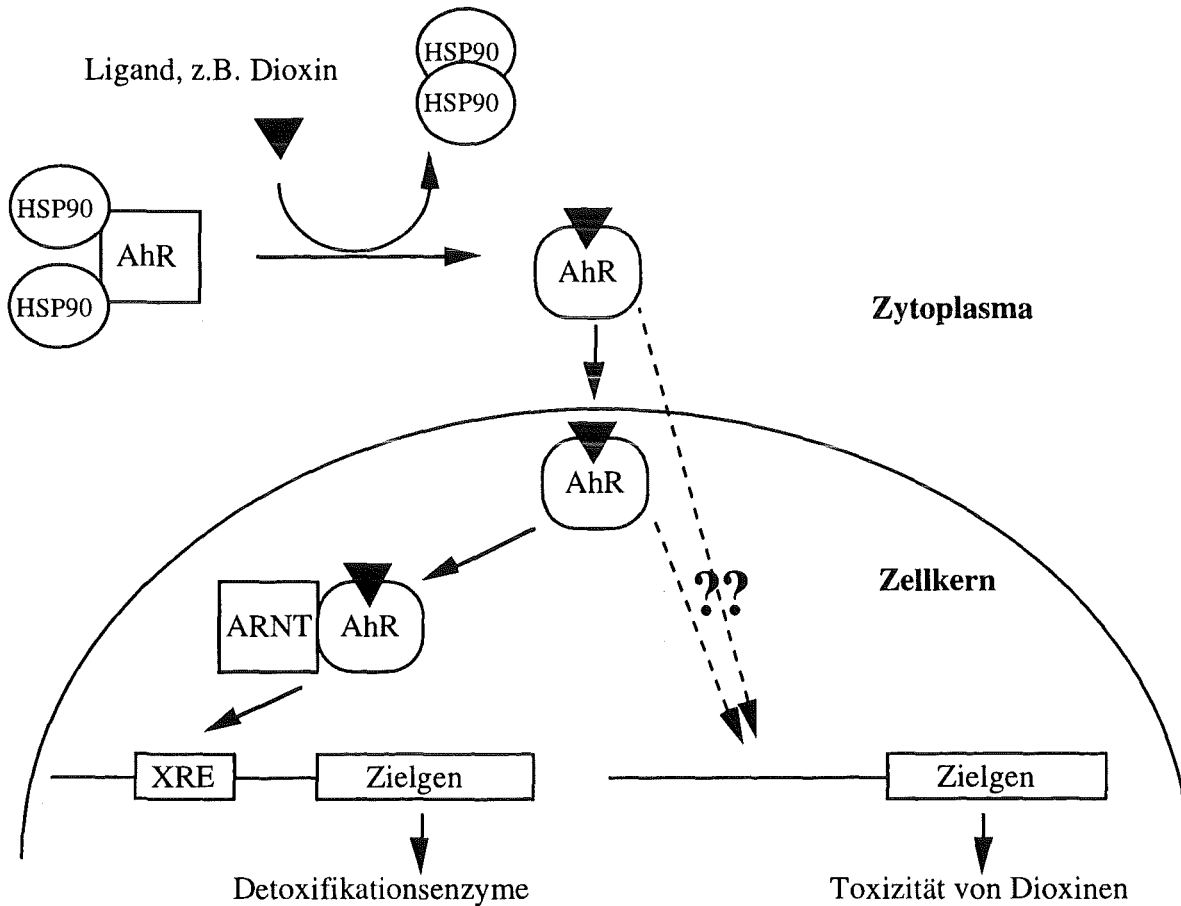
Die Analyse von mutierten Maushepatomzellen, die nach Dioxin kein Cyp P450 IA1 induzieren können, zeigte verschiedene Komplementierungsgruppen (Legraverend *et al.*, 1982; Hankinson, 1983; Karenlampi *et al.*, 1988). Dies wies darauf hin, daß außer dem *AhR* und *Cyp IA1* weitere Gene für die Signaltransduktion wichtig sind. Die Klonierung eines solchen Gens führte zur Entdeckung eines Partnerproteins des Ah-Rezeptors. Dieses Protein ist für die Bindung an ein XRE notwendig und es wurde angenommen, daß es die Translokation des AhR in den Zellkern vermittelt. Deshalb wurde es als ARNT (engl. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) bezeichnet (Hoffman *et al.*, 1991; Reyes, *et al.*, 1992). Ob ARNT allerdings für die Translokation des Rezeptors essentiell ist, wurde später in Frage gestellt, da dieser auch in ARNT defizienten Zellen nach Ligandenbindung in den Kern transloziert (Pollenz *et al.*, 1994).

Eine Reihe weiterer biochemischer Studien (die oft in Analogie zu den Untersuchungen der Steroidhormonrezeptoren durchgeführt wurden) zeigte, daß zusätzlich noch HSP90 (engl. *heat shock protein*) an der Funktion des AhR beteiligt ist (Okey *et al.*, 1994).

Der im Zytoplasma lokalisierte AhR ist in einem Komplex mit dem Hitzeschockprotein HSP90 gebunden. HSP90, das als Chaperon (zu Deutsch: „Anstandsdame“) wirkt, ermöglicht durch Aufrechterhaltung einer hochaffinen Proteinkonformation die Ligandenbindung des AhR und verhindert die Dimerisierung mit dem Partnerprotein ARNT. Nachdem der AhR einen Liganden gebunden hat, wird er aus dem inaktiven Komplex mit HSP90 freigesetzt, erwirbt eine hohe Affinität zum Zellkern und kann mit ARNT dimerisieren. Das AhR/ARNT-Heterodimer bindet dann an die XRE-

Zielssequenzen und induziert die Transkription der Zielgene (wie z.B. *Cyp 1A1*) (Poellinger *et al.*, 1992)

Zusammenfassend stellt sich die Funktion des AhR wie folgt dar:



**Abb.2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion durch den AhR.** Gezeigt ist eine vereinfachte Skizze der durch Dioxine und andere Liganden ausgelösten Ereignisse, die schließlich zur Induktion von bekannten Zielgenen wie *Cyp 1A1* führen. Wie der AhR Zielgene reguliert, die für die Giftigkeit von Dioxinen verantwortlich sind ist nicht bekannt (näheres im Text).

AhR: *aryl hydrocarbon receptor*, ARNT: *AhR nuclear translocator*, hsp90: *heat shock protein 90*, XRE: *xenobiotic responsive element*

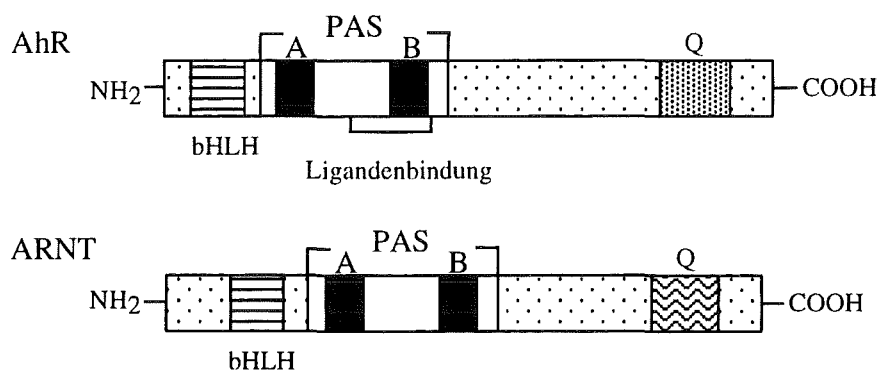
### Proteinstruktur von AhR und ARNT

Die Klonierung und Sequenzierung der cDNAs für AhR und ARNT sowie die Analyse der rekombinant exprimierten Proteine ergab eine vergleichbare Struktur beider Transkriptionsfaktoren (Hoffman *et al.*, 1991; Burbach *et al.*, 1992; Ema *et al.*, 1992) (siehe Abb.3).

Der Aminoterminus beider Proteine enthält die DNA-bindende bHLH- (engl. *basic region helix-loop-helix*) Domäne. Die bHLH-Domäne setzt sich zusammen aus einem

vorwiegend basische Aminosäuren enthaltenden Teil (*basic region HLH*), welcher an die DNA bindet. Daran schließen sich zwei, durch eine Schleife getrennte, Helices (*bHLH*) an, die als Dimerisierungsoberfläche mit dem jeweiligen Partnerprotein dienen. Zentral liegt ein Bereich der im AhR und in ARNT sowie in zwei Drosophila Proteinen Period (Nambu *et al.*, 1991) und Sim (Takahashi, 1992)) homolog ausgebildet ist und deshalb PAS (*Per-, ARNT-, Sim-Homologie*)-Domäne genannt wird. Die PAS-Domäne ist notwendig und ausreichend für die AhR-ARNT Dimerisierung, welche zusätzliche durch die bHLH-Domänen von AhR und ARNT stabilisiert wird (Dolwick *et al.*, 1993; Reisz-Porsszasz *et al.*, 1994; Weiß *et al.*, 1996).

Die ligandenabhängige Regulation des AhR/ARNT-Komplexes erfolgt über eine zentrale Domäne im Rezeptorprotein, die mit dem carboxyterminalen Teil der PAS-Domäne überlappt. Dieser Bereich des Rezeptors ist auch für die Bindung von HSP90 verantwortlich. Im Carboxyterminus beider Proteine befindet sich je eine glutaminreiche Region, die vermutlich die Transaktivierung der regulierten Gene vermittelt (Whitelaw *et al.*, 1993 und 1994; Jain *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1994;; Weiß *et al.*, 1996)



**Abb.3: Proteinstruktur von AhR und ARNT.** Dargestellt sind die einzelnen Domänen innerhalb des AhR- und ARNT-Proteins. bHLH: *basic region helix-loop-helix*, PAS: *Per-Arnt-Sim*-Homologiedomäne, A,B: 51 Aminosäurenwiederholung innerhalb der PAS-Region, Q: Glutaminreiche Region (Erläuterung siehe Text).

Die bisher bekannten Zielgene des AhR lassen sich nach ihrer Funktion in zwei Untergruppen aufteilen:

Die erste Untergruppe von Genen kodieren sowohl für Phase I Enzyme (wie z.B. CYP P450 IA1, CYP P450 IA2, CYP P450 IB1), welche Fremdstoffe zu reaktiven Intermediaten oxidieren, als auch für Phase II Enzyme (UDP-Glucuronyltransferase, Glutathion-S-Transferase), die diese Intermediate durch Konjugation (z.B. mit Zucker- oder Glutathionresten) hydrophiler und somit leichter ausscheidbar machen. Der AhR wirkt auf die sich in den Promotoren dieser Gene befindenden XRE-Elemente (Nebert *et al.*, 1993).

Die zweite Untergruppe umfaßt Gene, die die Zellproliferation, Differenzierung und die Zellmatrix beeinflussen, wie IL1 $\beta$  (*Interleukin 1 $\beta$* ), TGF $\alpha$  (engl. *transforming growth factor*

$\alpha$ ) und PAI-2 (engl. *plasminogen activator inhibitor 2*) (Sutter *et al.*, 1991; Gaido *et al.*, 1992). Bisher ist jedoch nicht bekannt, wie der AhR diese Gene reguliert.

### **Zellmodelle zum Verständnis der biologischen Effekte von TCDD**

Die toxischen Effekte von TCDD wie die Induktion von Hyperkeratose (als Ursache für Chlorakne), Immuntoxizität, Teratogenität und Kanzerogenität lassen sich als Veränderungen in der Zellproliferation und Zelldifferenzierung interpretieren. Bisher existieren nur wenige Zellmodelle, in denen der Wirkungsmechanismus von TCDD als kausal zusammenhängende Abfolge von molekularen Prozessen analysierbar ist.

In Keratinozyten und abgeleiteten Zelllinien können die Effekte auf Hyperkeratinisierung studiert werden und eine Reduktion des EGF-Rezeptors konnte mit TCDD-induzierter Differenzierung korreliert werden (Hudson *et al.*, 1985). In anderen Zelllinien hemmt TCDD die Zellproliferation und führt zur Akkumulation der Zellen in der G1-Phase (Moore und Weiss, 1982; Wiebel *et al.*, 1991; Fernandez und Safe, 1992; Holcomb und Safe, 1994; Vogel und Abel, 1995; Wang *et al.*, 1998).

### **Rattenhepatomzellen als Modellsystem für die Proliferationshemmung durch TCDD**

Eine Verzögerung des Zellzyklus ist in Rattenhepatomzellen (5L-Zellen) schon nach 4h sichtbar (Wiebel *et al.*, 1991). Obwohl die G1-S Progression schon nach 4h gehemmt wird, nimmt die zelluläre Proteinmenge noch für mindestens 24h unverändert zu, was zu einer Dissoziation von Wachstum und Proliferation und damit zu einer Zunahme der Zellgröße führt (Göttlicher und Wiebel, 1991; Wiebel *et al.*, 1991). Mehrere Befunde weisen darauf hin, daß der Ah-Rezeptor die Wachstumshemmung vermittelt. Beim Vergleich von verschiedenen aromatischen Kohlenwasserstoffen und halogenierten Kohlenwasserstoffen korrelieren Aktivierung des Rezeptors und Hemmung der Proliferation.

Von den 5L-Zellen wurden Varianten (BP8-Zellen) isoliert, die keinen funktionellen Ah-Rezeptor mehr enthalten. TCDD hemmt in diesen Varianten nicht mehr die Proliferation und damit ist eine Rolle des Ah-Rezeptors in der Vermittlung der Wachstumshemmung durch TCDD wahrscheinlich (Göttlicher *et al.*, 1990). Bestätigt wurde diese Annahme dadurch, daß die stabile Transfektion eines Expressionsplasmids für den AhR in diesen Varianten die Hemmung der Proliferation durch Dioxine wieder ermöglicht (Teil dieser Arbeit, Weiß *et al.*, 1996).

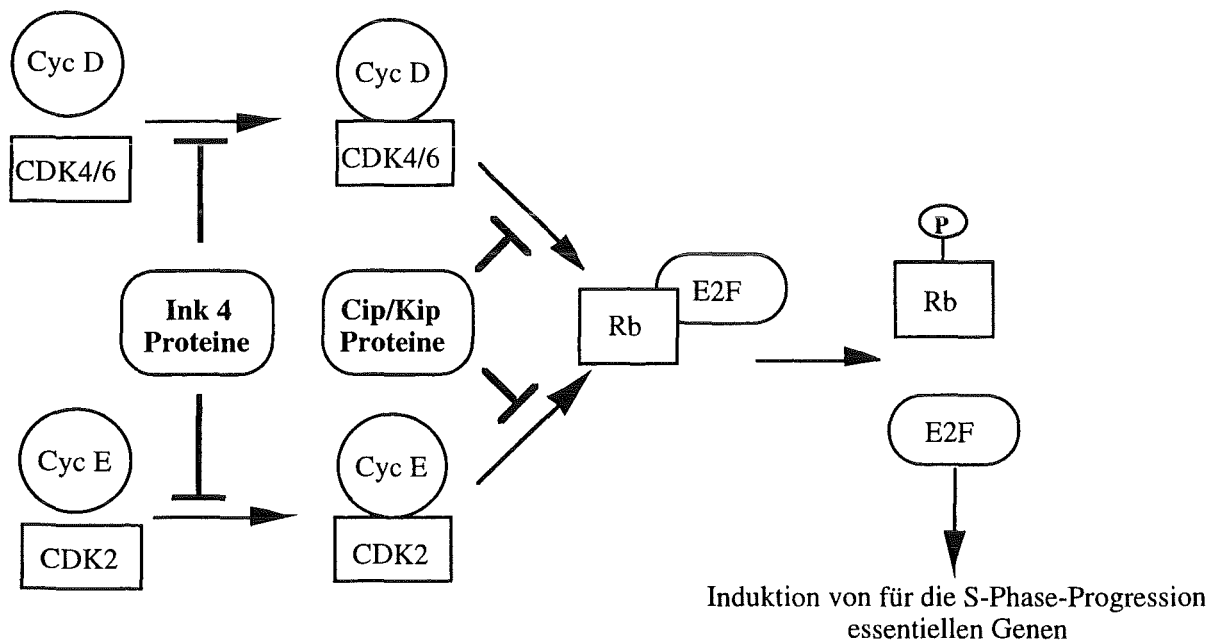
Unklar war zu Beginn der Arbeit, in welcher Weise der AhR die Proliferation hemmt. Für ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren sind mehrere Wirkungsweisen vorstellbar, wie sie in zelluläre Prozesse eingreifen und auf die Proliferation wirken könnten. Für Steroidhormonrezeptoren konnte zum Beispiel gezeigt werden, daß sie neben ihrer klassischen Transaktivierung von Genen auch mit zellulären Signalwegen wechselwirken, die durch Wachstumsfaktoren reguliert sind. Beispiele solcher Wechselwirkungen sind die Aktivitätshemmungen der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκ-B (auch „Transrepression“ genannt) (Jonat *et al.*, 1990, Schüle und Evans, 1991, Göttlicher *et al.*, 1998). Überraschenderweise können sie auch zyttoplasmatische Signaltransduktionskaskaden modulieren (Migliaccio *et al.*, 1996 und 1998; Caelles *et al.*, 1997; Peterziel, 1998). Für den AhR ist ebenso bekannt, daß er Signaltransduktionswege beeinflussen kann und hierbei beispielsweise p60<sup>c-Src</sup> aktiviert oder mit Wachstumsfaktorsignalen interferiert (Hudson *et al.*, 1985; Lin *et al.*, 1991; Enan und Matsumura, 1995). Außerdem bindet der AhR auch an zellzyklusregulierende Proteine wie Rb und CDK2 (Ge und Elferink, 1998; Denison *et al.*, 1998), deren Funktion im weiteren besprochen werden soll.

### **Zellzyklusregulation in Säugerzellen**

Der Zellzyklus von Eukaryonten wird in vier Abschnitte eingeteilt: In proliferierenden Zellen dient die G1-Phase (engl. *gap*) als Vorbereitung zur S-Phase (engl. *synthesis*), in der vor allem der Chromosomensatz repliziert wird. Beenden Zellen die Proliferation in der G1-Phase um später eventuell zu differenzieren bezeichnet man diese auch als G0-Phase. Über die G1-Phase erfolgen auch die Übergänge zwischen proliferierenden und ruhenden Zellen in die G0-Phase. Nach einer zweiten Vorbereitungsphase, der G2-Phase, schließt sich die Mitose an, wobei der verdoppelte Chromosomensatz gleichmäßig auf die entstehenden Tochterzellen verteilt wird.

Da TCDD schon 4 h nach Behandlung den S-Phase-Eintritt hemmt und somit in die G1-S-Progression eingreift, soll hier nur die Regulation dieses Zellzyklusabschnitts näher beschrieben werden (siehe auch Abb.4). Der Übergang von der G1-Phase zur S-Phase wird durch einen wesentlichen Kontrollpunkt, dem Restriktionspunkt, kontrolliert. Nach dessen Überwindung ist die Komplettierung des Zellzyklus unabhängig von der weiteren Stimulierung durch Wachstumsfaktoren (Pardee, 1989). Biochemisch läßt sich der Restriktionspunkt mit der Phosphorylierung des Produkts des Retinoblastom Tumorsuppressorgens (pRb) korrelieren (Weinberg, 1995; Bartek *et al.*, 1996). In seiner hypophosphorylierten Form hemmt es durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren aus der E2F-Familie die Zellzyklusprogression. Nach mehrfacher Phosphorylierung verliert das hyperphosphorylierte Rb seine Affinität zu E2F, welches nun die für die Replikation

notwendigen Gene induzieren kann. Die Phosphorylierung von Rb wird durch Zyklin D- und Zyklin E-abhängige Kinasekomplexe gesteuert. Während der G1-Progression steigt die Menge an Zyklin D-Protein (je nach Zelltyp D1, D2, D3) und interagiert mit den zyklinabhängigen Kinasen CDK4 oder CDK6 (engl. *cyclin dependent kinase*). Etwas verzögert erhöht sich auch die Menge des Zyklin E-Proteins, welches durch Assoziation mit CDK2 einen aktiven Kinasekomplex bildet. Während die Proteinmenge der Zykline über den Zellzyklus variiert (daher der Name Zykline), bleiben die Mengen der CDKs konstant. Die katalytische Aktivität der CDKs wird vor allem durch aktivierende und inaktivierende Proteinkinasen gesteuert (Weinberg, 1995; Bartek *et al.*, 1996).



**Abb 4:** Schematische Darstellung der wesentlichen Elemente zur Kontrolle des Restriktionspunkts.

Cyc: *cyclin*; CDK: *cyclin dependent kinase*, Ink: *inhibitor of kinase*; Kip: *kinase inhibitor protein*; Rb: Retinoblastom Protein (Erklärung siehe Text).

Durch die Integration extrazellulärer Signale erfolgt die Entscheidung, ob eine Zelle Rb phosphoryliert und somit den Restriktionspunkt überwindet oder im Wachstum stoppt und eventuell differenziert. Eine Möglichkeit die Rb-Phosphorylierung zu verhindern, besteht in der Hemmung der Zyklin/CDK-Komplexe durch die Induktion von kleinen inhibitorischen Proteinen, die als CDK-Inhibitoren (CKIs) bezeichnet werden. Aufgrund von Sequenzhomologien und biochemischen Ähnlichkeiten werden die CKIs in die Cip/Kip- (engl. *kinase inhibitor protein*) Familie bestehend aus p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> und p57<sup>Kip2</sup> und die Ink 4- (engl. *inhibitor of kinase 4*) Familie mit p15<sup>Ink4B</sup>, p16<sup>Ink4A</sup>, p18<sup>Ink4C</sup> und p19<sup>Ink4D</sup> eingeteilt. Die Mitglieder der Ink4-Familie binden an CDK4 und CDK6, wodurch die Assoziation mit Zyklin D und somit die Bildung eines aktiven Kinasekomplexes verhindert wird. Die Inhibitoren aus der Cip/Kip-Familie hingegen hemmen die Kinaseaktivität durch

Bindung an den schon assoziierten Zyklin/CDK-Komplex (Lees, 1995; Sherr and Roberts, 1995; Harper und Elledge, 1996; Hengst und Reed, 1998).

Die Regulation von CKIs durch extrazelluläre Signale wurde zuerst für p21<sup>Cip1</sup> genauer untersucht. Exogene Noxen, wie UV- oder Gammastrahlung, aber auch genotoxische Substanzen führen zur Stabilisierung des Tumorsuppressorgenprodukts p53, welches die Transkription des *Cip1*-Gens erhöht und der Zelle durch die Verzögerung des Zellzyklus mehr Zeit zur DNA-Reparatur läßt. In den meisten menschlichen Tumoren (über 50%) wie auch sehr vielen Zelllinien ist das *p53* Gen mutiert und führt zu einem inaktiven Protein, das zur unkontrollierten Proliferation und genomischen Instabilität der betroffenen Zelle beiträgt (Vogelstein und Kinzler, 1992 und 1993; Blattner *et al.*, 1994; Herrlich, 1997).

Weitere Induktoren von CKIs sind zum Beispiel der Transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), Rapamycin, zyklisches AMP, Entzug von Wachstumsfaktoren sowie zu hohe Zelldichte (Übersicht in Hengst und Reed, 1998). Zusätzlich zu ihrer Funktion im Zellzyklus spielen CKIs auch eine Rolle bei der Differenzierung von Zellen (Übersicht in Hengst und Reed, 1998) und dem programmierten Zelltod (Levkau *et al.*, 1998).

### **TCDD und Proto-Onkogene**

Krebs wird heute als ein mehrstufiger Prozeß angesehen. Man nimmt an, daß zu Beginn der Krebsentstehung bestimmte Gene (Proto-Onkogene) irreversibel zu Krebsgenen (Onkogenen) mutieren, deren erhöhte Aktivität der initiierten Zelle Vorteile bei der Proliferation oder dem Überleben bieten. Nach der klonalen Expansion der initiierten Zelle sind weitere genetische Schritte, wie z.B. der Verlust von Tumorsuppressorgenen, notwendig, um zum unkontrolliertem und invasivem Wachstum des Primärtumors zu führen (Vogelstein und Kinzler, 1992 und 1993).

Tumorpromotoren können nach Aktivierung intrazellulärer Signalwege entweder zur kurzfristigen oder zur dauerhaften Aktivierung einiger dieser Proto-Onkogene führen und begünstigen dadurch die klonale Expansion der initiierten Zelle. Wesentlich für die irreversible Transformation der Zelle zur Tumorzelle scheint die langfristige Aktivierung von Proto-Onkogenen zu sein (Miao und Curran, 1994; Bakin und Curran, 1999).

TCDD kann die Proto-Onkogene *ras* (Tullis *et al.*, 1992; Ramakrishna und Anderson, 1998), *c-src* (Enan und Matsumura, 1996; Blankenship und Matsumura, 1997) und Mitglieder aus der AP-1 (engl. *activating protein 1*)-Familie (Puga *et al.*, 1992; Hoffer *et al.*, 1996) aktivieren, wobei die Rolle des AhR hierbei noch umstritten ist. Die Integration von



extrazellulären Signalen, die durch Signaltransduktionskaskaden zur AP-1-Aktivierung führen, kann sowohl negativ als auch positiv auf die Zellproliferation wirken (Angel und Karin, 1991; Marshall, 1995; Whitmarsh und Davis, 1996 und 1998; Minden und Karin, 1997). Die oft widersprüchlichen Wirkungen auf die Zellproliferation sollen kurz anhand einiger Beispiele verdeutlicht werden. Das Onkogen *Ras* wirkt zelltypspezifisch zum einen fördernd auf die Proliferation zum anderen aber auch proliferationshemmend oder gar apoptotisch (Peeper *et al.*, 1997; Olson *et al.*, 1998; Mayo *et al.*, 1997). Die Aktivierung von Jun D, einem Mitglied der *Jun*-Proto-Onkogenfamilie, hemmt die Proliferation, während umgekehrt c-Jun und Jun B eher notwendig scheinen für die Proliferation (Pfarr *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996; Mehta *et al.*, 1997). Auch die Tumorpromotoren TPA und Okadaic Acid können, trotz gleichzeitiger MAP-Kinase-Aktivierung, zelltypspezifisch das Wachstum hemmen (Schönthal und Feramisco, 1993; Huang *et al.*, 1995). P38-MAPK Aktivität scheint in manchen Zellen notwendig für die Proliferation jedoch in anderen Zellen eher proliferationshemmend (Molnar *et al.*, 1997; Hunt *et al.*, 1999; Rausch und Marshall, 1999). Weshalb die zur AP-1 führende Signaltransduktion je nach Zelltyp zum einen proliferationsfördernd-bzw. -hemmend wirkt ist bisher noch nicht verstanden. Zum Verständnis der Differenzierungs- und Proliferationseffekte von Dioxinen könnte die Analyse der Regulation von AP-1 einen wesentlichen Beitrag liefern.

### **Regulation des Transkriptionsfaktors AP-1**

Die unter dem Sammelbegriff AP-1 zusammengefaßten Transkriptionsfaktoren umfassen sowohl Proteinhomodimere aus der Proto-Onkogenfamilie Jun (c-Jun, JunB, JunD) und der ATF/CREB-Familie (ATF-2, ATF-a) sowie Proteinheterodimere aus der Jun-Proteinfamilie assoziiert mit Proteinen der ATF/CREB-Familie oder der Fos- (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) Proto-Onkogenfamilie. Die Regulation von AP-1 ist anhand der Expression von *c-Jun* und *c-Fos* genauer untersucht worden.

Die Expression dieser Proto-Onkogene wird sowohl transkriptionell als auch posttranskriptionell reguliert. An die verschiedenen Enhancerelemente in der „stromaufwärts“ gelegenen Promotorregion des *c-Jun*- bzw. *c-Fos*-Gens binden Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität durch Proteinkinasekaskaden reguliert wird. Hierbei spielen die MAP- (engl. *mitogen activated protein*-) Kinasen eine zentrale Rolle. Diese unterteilen sich in die drei Unterfamilien der ERK- (engl. *extracellular signal regulated kinase*) Familie, der JNK- (engl. *Jun-N-terminal Kinase*) und der p38-MAPK-Familie (Marshall, 1995; Minden *et al.*, 1997; Whitmarsh und Davis, 1996 und 1998).

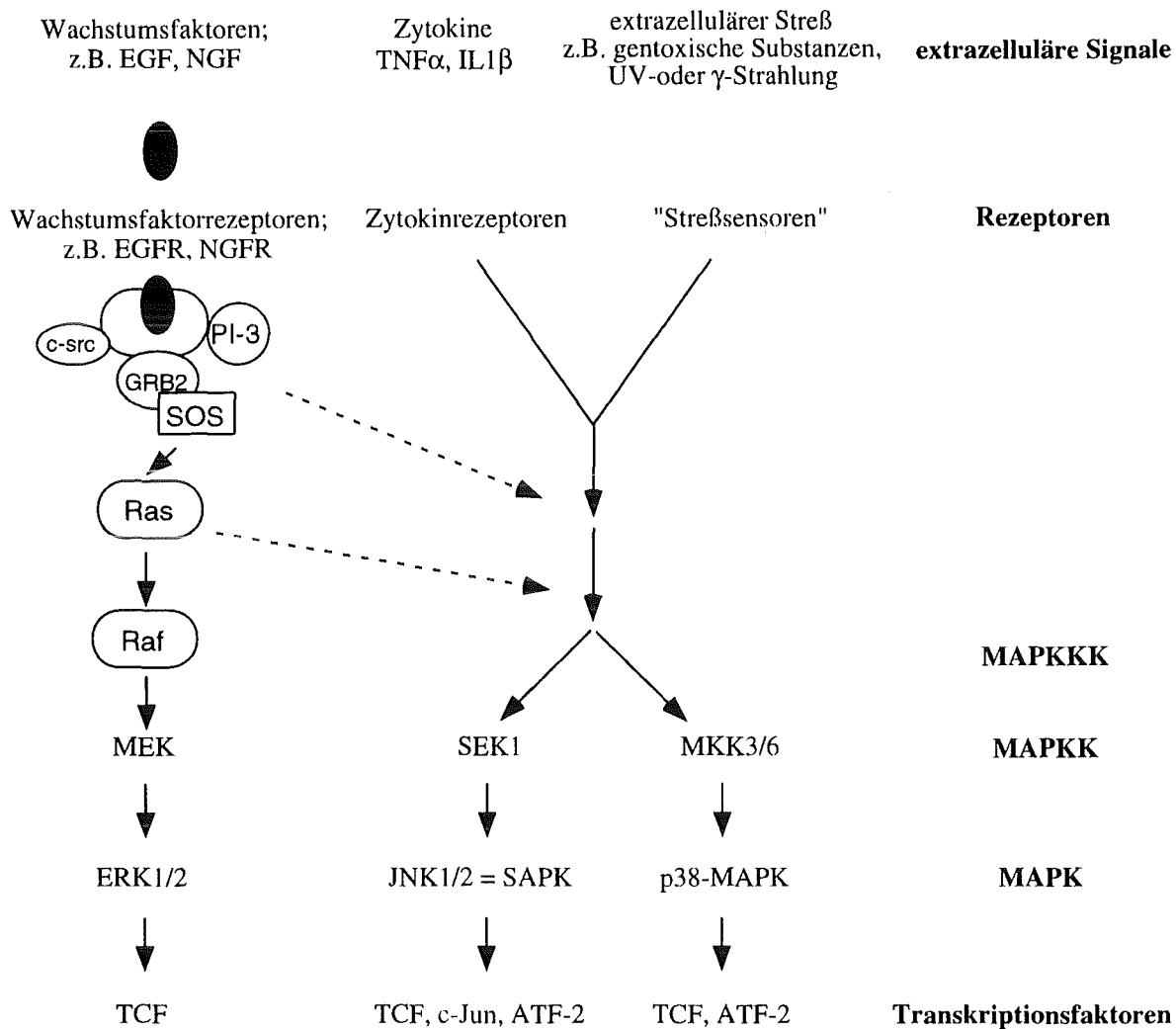
MAP-Kinasen phosphorylieren ihre Substrate an einem Serin- oder Threoninrest, denen jeweils ein Prolin folgt, weshalb sie auch als „Prolin-gerichtete-Kinasen“ bezeichnet werden. Die Aktivierung der MAP-Kinasen erfolgt durch die Phosphorylierung an einem Threonin und einem Tyrosin durch übergeordnete MAPK-Kinasen. Diese MAPK-Kinasen werden wiederum von Serin/Threonin-spezifischen Kinasen, den MAPKK-Kinasen aktiviert (siehe auch Abb.5).

Wie regulieren extrazelluläre Signale diese MAP-Kinase-Kaskaden? Die Familie der ERK-Kinasen wird vor allem durch Mitogene, wie z. B. Wachstumsfaktoren aber auch nach UVC-Bestrahlung über die Vermittlung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren aktiviert. Die aktivierten Wachstumsfaktor-Rezeptoren übertragen das extrazelluläre Signal über Adaptorproteine, wie z.B. GRB 2 und unter Beteiligung des GTP-Austauschproteins SOS und der Kinase c-src auf das Proto-Onkogenprodukt Ras. Aktiviertes Ras bewirkt die Translokation von Raf an die Zellmembran, wo Raf über einen bisher unzureichend verstandenen Mechanismus aktiviert wird. Die Familien der JNK- und P38-MAP-Kinasen werden hauptsächlich durch inflammatorische Zytokine sowie „zellulären Streß“ wie z. B. hyperosmotische Bedingungen, DNA-schädigende Agenzien sowie UV-Strahlung, aktiviert.

Wie dieses komplexe Netzwerk die Induktion von Zielgenen vermittelt, soll kurz anhand je eines Beispiels für die *c-Jun* - und die *c-Fos*-Induktion erläutert werden (siehe auch Abb.5). Zellulärer Stress, wie z.B. UVC-Strahlung, führt zur Aktivierung von JNK und somit zur Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren c-Jun bzw. ATF-2. Heterodimere von c-Jun und ATF-2 aber auch ATF-2 Homodimere vermitteln über die Elemente jun1 und jun2 im *c-Jun*-Promotor die verstärkte Transkription des *c-Jun*-Gens (van Dam *et al.*, 1993; Herr *et al.*, 1994, van Dam *et al.*, 1995).

Als weiteres Beispiel zur Signalintegration dient die Kontrolle des *c-Fos*- Gens durch das Promotorelement SRE (engl. *serum response element*). An das SRE bindet ein Homodimer des Transkriptionsfaktors SRF (engl. *serum response factor*), das durch Interaktion mit einem weiteren Transkriptionsfaktor aus der TCF- (engl. *ternary complex factor*) Familie einen ternären Komplex bildet. Dieser Proteinkomplex kann durch alle drei MAP-Kinasen phosphoryliert werden und integriert dadurch die unterschiedlichen Signalwege, die letztendlich zur Transaktivierung des *c-Fos*-Gens führen.

Das komplexe Netzwerk der Signaltransduktion durch die MAP-Kinase-Kaskade ist in Abb. 5 schematisch dargestellt.



**Abb 5: Schematische Darstellung der zur AP-1-Aktivierung führenden Signaltransduktionskaskaden.**

ATF: *activating transcription factor*; c-src: c-src-Kinase, EGF: *epidermal growth factor*; ERK: *extracellular signal-regulated kinase*; GRB: *growth factor binding protein*, IL1 $\beta$ : *Interleukin1 $\beta$* ; JNK: *Jun-N-terminal kinase*; MAPK: *mitogen activated protein kinase*; MAPKK: *MAPK Kinase*; MAPKKK: *MAPKK Kinase*, MEK: *MAPK/ERK Kinase*; MKK: *MAP Kinase Kinase*; NGF: *neuronal growth factor*; PI-3: *Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase*, SAPK: *stress activated protein kinase*; SEK: *SAPK/ERK Kinase*; SOS: *son of sevenless*, TCF: *ternary complex factor*; TNF $\alpha$ : *Tumornekrosefaktor  $\alpha$* ; UV: *ultraviolette Strahlung* (näheres im Text).

Außer physiologischen Aktivatoren, wie z. B. Wachstumsfaktoren oder Zytokinen, wirken auch viele Tumorpromotoren auf die MAP-Kinase-Kaskade (Übersicht in Marshall, 1995; Whitmarsh und Davis, 1996). Die Aktivierung der MAP-Kinasen durch Tumorpromotoren erfolgt durch zwei voneinander unterscheidbare Mechanismen. Die Phosphorylierung der MAP-Kinase wird zum einen durch die MAPK-Kinase verstärkt. Der Phorbol ester TPA beispielsweise aktiviert die RAF-Kinase und führt dadurch zur ERK-Aktivierung. Da die phosphorylierte MAP-Kinase wieder dephosphoryliert wird, kann auch die Hemmung der MAP-Kinase-Phosphatase zur verstärkten MAP-Kinase-Aktivität führen. Dieser Mechanismus der MAP-Kinase-Aktivierung durch Hemmung der MAP-Kinase-Phosphatase(n) wurde für die JNK-Aktivierung durch den Tumorpromotor Arsenit beschrieben (Cavigelli *et al.*, 1996).

## **Ziele der vorliegenden Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit wurden 5L-Zellen als Modellsystem für toxische Wirkungen von Dioxinen (TCDD) genutzt, weil Dioxine die Progression dieser Zellen durch den Zellzyklus erheblich verzögern. Durch Verwendung dieses Zellmodells sollten Signalwege und 'zelluläre Effektor-Moleküle' identifiziert werden, über die Dioxine wie TCDD Toxizität und insbesondere eine Fehlregulation des Zellzyklus bewirken können. Dazu wurde zunächst die Frage (i) geklärt, ob der Ah-Rezeptor die Wirkung von Dioxinen vermittelt. Die proliferationshemmende Wirkung von Dioxinen wurde unter zwei Fragestellungen analysiert, indem untersucht wurde, (ii) welchen Einfluß TCDD auf die grundlegenden regulatorischen Proteine und Kinasen in der G1-S-Progression hat, und (iii) wie TCDD auf die Aktivität von Mitogen-aktivierten Signaltransduktions-Kaskaden sowie die dadurch regulierten Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie wirkt.

### **i) Vermittelt der Ah-Rezeptor die Hemmung der Proliferation von 5L-Zellen durch TCDD?**

Durch stabile Expression des AhR in den rezeptordefizienten und dioxinresistenten BP8-Abkömmlingen der 5L-Zellen sollte die Sensitivität gegenüber Dioxinen wiederhergestellt werden.

### **ii) Wie werden die grundlegenden Prozesse der G1-S-Phasen-Progression in 5L-Zellen durch TCDD reguliert?**

Zunächst sollte ausgehend von der Beeinflussung der Rb-Phosphorylierung durch TCDD die Aktivität der zur Rb-Phosphorylierung notwendigen verschiedenen Zyklin/CDK-Komplexe sowie die Proteinmengen der verschiedenen Zyklin- bzw. CDK-Untereinheiten bestimmt werden. Zusätzlich sollte die Regulation der p53-Proteinmenge durch TCDD analysiert werden.

Desweiteren sollte geklärt werden, ob die TCDD-vermittelte Proliferationshemmung ein transkriptionsabhängiger Prozeß ist.

### **iii) Wie greifen Dioxine in die zur AP-1-Aktivierung führenden Signaltransduktionskaskaden in 5L-Zellen ein?**

Hierzu sollte zunächst die AP-1-Aktivität in 5L-Zellen nach Dioxinbehandlung bestimmt werden. Wesentliche Indikatoren für verstärkte MAPK-Aktivität sind eine erhöhte

AP-1-Aktivität und erhöhte mRNA-Mengen der „klassischen“ MAPKs-Zielgene *c-Jun* und *c-Fos*. Zur Untersuchung, ob TCDD in 5L-Zellen in die zur AP-1-Aktivierung führenden Signaltransduktionswege eingreift, wurde deshalb zunächst die Aktivität von AP-1 und die mRNA-Mengen von *c-Jun* und *c-Fos* nach TCDD-Behandlung bestimmt. Anschließend sollte die Aktivität der für die *c-Jun* - bzw. *c-Fos* -Regulation relevanten MAP-Kinasen untersucht werden und mögliche Angriffspunkte des AhR in den MAPK-Kaskaden eingegrenzt werden.

## 2 Material

### 2.1 Bezugsquellen

Chemikalien wurden soweit nicht gesondert aufgeführt von der Firma Merck, Darmstadt, Carl Roth GMBH & Co, Karlsruhe und Sigma Chemie GMBH, Deisenhofen bezogen, Enzyme wurden, soweit nicht anders aufgeführt, von Boehringer, Mannheim, Promega Biotec, Heidelberg oder NEB, Schwalbach/ Taunus bezogen. Radiochemikalien wurden von Amersham, Braunschweig bezogen.

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Appligene, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat	Bio Rad, München
Ampicillin	Sigma, München
ATP, CTP, GTP, TTP	Boehringer, Mannheim
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit
Bakterienschalen (9 cm)	Greiner, Nürtingen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA, Fraktion V	Roth, Karlsruhe
DEAE-Membran, NA45	Schleicher&Schuell, Dassel
Desoxy-Nukleosidtriphosphate	Pharmacia, Freiburg
Dimethylsulfoxid	Fluka, Neu-Ulm
Dithiothreitol	BRL Inc., Neu-Isenburg
DMEM	Gibco, Karlsruhe
EDTA	Serva, Heidelberg
EGTA	Sigma, München
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ficoll 400	Serva, Heidelberg
Fötales Kälberserum	Gibco, Karlsruhe
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Geneticin <sup>®</sup> -sulphat (G418)	Gibco, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Boehringer, Mannheim
Glycylglycin	Sigma, München
HEPES	Sigma, München
Luziferin	Biosynth AG, Staad (Schweiz)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

MOPS	Roth, Karlsruhe
Mikrotiterplatten	Greiner, Nürtingen
N-Broth	Difco Laboratories, Detroit
N,N'-Methylen-bisacrylamid	Bio Rad, München
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
1- und 2-Propanol	Merck, Darmstadt
Quiagen-tip-500-Säulen	Diagen, Düsseldorf
RNAse A	Boehringer, Mannheim
Röntgenfilme (HyperfilmMP)	Amersham, Braunschweig
RPMI 1640	Gibco, Karlsruhe
Sephadex G50	Roth, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Bio Rad, München
<sup>3</sup> H-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (spez. Aktivität: 600dpm/pmol)	L. Poellinger, Stockholm
Tris-HCl, Tris-Base	Sigma, München
TritonX-100	Bio Rad, München
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Whatman 3MM-Papier	Bender & Hobein, Karlsruhe
Zellkulturschalen	Greiner, Nürtingen
übrige Feinchemikalien	Merck, Darmstadt; Fluka, Neu-Ulm

## 2.2 Bakterien und Zellen

### **E. coli DH5 $\alpha$**

Rekombinationsdefekte, suppressive Linie

(supE44 $\Delta$ lacU169 $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 hsdR17recA1endA1gyrA96thi-1 relA1)

### **5L-, BP8-, D1-Zellen**

5L-Rattenhepatomzellen und deren Varianten BP8 und D1 zur Verfügung gestellt von M. Göttlicher und F. J. Wiebel (GSF, München).



## **2.3 Kulturmedien**

### **Bakterien-Selektionsmedium**

N-Broth (1% N-Broth, 0,5% Hefeextrakt) mit 100 µg/ml Ampicillin

### **LB-Medium**

1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl)

### **Selektivagar**

1.5% Bacto-Agar, 1% Bactotrypton, 1% NaCl, 0.5% Hefeextrakt, 100 µg/ml Ampicillin

### **SOB-Medium**

2% Bakto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7,0

### **Standard-Kulturmedium für eukaryontische Zellen**

Es wurde Dulbeccos Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin' und 100 µg/ml Streptomycin verwendet.

## **2.4 Puffer und Lösungen**

### **Coomassie-Färbelösung**

0.25% Serva Blue G250, 46% Methanol und 8% Essigsäure

### **Denaturierungspuffer**

65% Formamid, 13% 10xMOPS-Laufpuffer, 22% Formaldehyd(37%)-haltige Lösung

### **100xDenhardt's Lösung**

2% BSA, 2% Ficoll, 2% Polyvinylpyrrolidon

### **5xDNA-Probenpuffer**

10 mM EDTA, pH 8,0, 10% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau

### **Fixierungslösung**

8% Formaldehyd und 2% Methanol gelöst in PBS

### **Gesamt-RNA-Lysispuffer**

4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, pH 7,0, 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,5% Natrium-lauroylsarcosin

### **GlyGly-Puffer**

25 mM Glycylglycin, 15 mM  $MgSO_4$ , 4 mM EGTA, pH 7,8

### **Hybridisierungslösung**

4xSSC, 10 mM EDTA, 0,1%SDS, 20 mg/ml Heringssperma-DNA

### **HSB-Puffer**

300 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,4, 5 mM EDTA, 0,1%SDS

### **Kinase-Lysispuffer**

50 mM Hepes-KOH pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2,5 mM EGTA; 0,1% Tween 20 in 10% Glycerin; kurz vor der Verwendung frisch zugegeben: 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF, 10 mg/ml Leupeptin; 10 mg/ml Aprotinin; 10 mM  $\beta$ -Glycerophosphat; 0,1 mM  $Na_3VO_4$

### **Kinasepuffer**

50 mM Hepes-KOH, pH 7,5; 10 mM  $MgCl_2$ ; 10 mM  $\beta$ -Glycerophosphat und 2,5 mM EGTA; kurz vor der Verwendung frisch zugegeben: 1 mM DTT; 0,1 mM  $Na_3VO_4$ ; 1 mM NaF

### **Laemmli Laufpuffer**

25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1% SDS

### **2xLaemmli-Probenpuffer**

125 mM Tris, pH 6,8, 4% SDS, 20% Glycerin, 2%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,01% Bromphenolblau

### **Luziferinlösung**

1 mM Luziferin in GlyGly-Puffer (0,28 mg/ml)

### **10xMOPS-Laufpuffer**

200 mM MOPS, 50 mM EDTA, pH 7.0

### **NP40-Lysispuffer**

10 mM Tris-HCL, pH 7,4, 10 mM NaCl, 3 mM  $MgCl_2$ , nach dem Autoklavieren wurde dem Puffer 0,5% NP40 zugesetzt

**20xPB**

0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ / 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6,85

**1xPBS, pH 7,3**

123 mM NaCl, 17 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

**PBST**

PBS mit 0,05% Tween 20

**Pippi**

0,5 M Natriumphosphat, pH 7,3, 1,5% Natriumpyrophosphat

**Polyacrylamid/ Harnstoff-TBE-Gellösung**

8M Harnstoff und 20% Acrylamid:Bisacrylamidlösung (30:0,8) in 1 x TBE, nach Filtration erfolgt die Polymerisation durch Zugabe von 0,1% TEMED und 0,1% APS

**Reaktionspuffer**

0.1 M KPi-Puffer (0,2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 0,2 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  , pH 7,6), 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA

**run-off-Einfrierpuffer**

50 mM Tris-HCL, pH 8,3, 40% Glycerin, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM EDTA

**run-off-Reaktionspuffer**

10 mM Tris-HCL, pH 8,0, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM DTT, 300 mM KCl, je 0,5 mM ATP, CTP, GTP und 100 mCi  $\alpha^{32}\text{P}$ -dUTP (20mCi/ml)

**20xSSC**

3 M NaCl, 0,3 M  $\text{Na}_3\text{citrat} \times 2\text{H}_2\text{O}$

**STE-SDS-Puffer**

20 mM Tris-HCL, pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA und 0,9% SDS

**5x Substratlösung**

125 nM Coelenterazin (Biosynth AG, Gstaad, Schweiz) in Reaktionspuffer

**1xTAE**

40 mM Tris, 40 mM NaAcetat, 2 mM EDTA, pH 8,3

**1xTE**

10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0

### **TBS-Puffer**

20 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, pH 7,6)

### **TBST-Puffer**

TBS-Puffer mit 0,05% Tween 20

### **Vorhybridisierungslösung**

4xSSC, 1xDenhardt's Lösung, 3% Pippi, 0,1% SDS

### **Waschlösung 1**

2xSSC, 3% Pippi, 0,1% SDS

### **Waschlösung 2**

1xSSC, 3% Pippi, 0,1% SDS

### **Western-Blot-Transferpuffer**

200 mM Glycin, 25 mM Tris-Base, 20% Methanol, pH 8,3

## **2.5 Verwendete Plasmide**

### **Plasmide zu Herstellung von Northern-Sonden:**

**pGAPDH:** Ein 1,3 kB-Fragment des Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Gens der Ratte wurde durch PstI-Verdau aus pGAPDH-13 (Fort *et al.*, 1985) isoliert.

**ph-cJ-1:** Ein 1,4 kB-Fragment des menschlichen c-jun Gens (Angel *et al.*, 1988) wurde aus ph-cJ-1 durch SmaI/HindIII-Verdau isoliert.

**pUC9/v-fos:** Ein 1 kB-Fragment des v-fos Gens wurde durch PstI Verdau aus pUC9/v-fos (Curran und Teich, 1982) isoliert.

## **Reporterplasmide:**

**pG5.E4Δ38lux3** (erhalten von P. Shaw, Nottingham, England):

Pentamer der Bindestelle des Hefetranskriptionsfaktors GAL4 vor den Positionen +1 bis +38 des Adenovirus E4 Promotors und dem Luziferase-Reporter.

**-73/+63 Coll-Luc** (zur Verfügung gestellt von M. Göttlicher): enthält den zwischen den Positionen -73 und +63 gelegenen Bereich des menschlichen Kollagenase I-Promotors, die vor das Luziferase-Reporter gen kloniert wurden (Deng und Karin, 1993).

**-42-Kip1-, -988-Kip1-, -1382-Kip1-, -1609-Kip1-Reporterplasmide** (zur Verfügung gestellt von A. Nordin): Enthalten die bis zu den unterschiedlichen Positionen angegebenen Bereiche des Kip1 Promotors der Maus, die in das Luziferase-Reporterplasmid pGL2-Basic (Promega, Mannheim) kloniert wurden (Kwon *et al.*, 1996).

**16/13-Kip1:** Nach Bsu36I-Verdau des -1609-Kip-Plasmids wurde der 5'-Überhang durch Klenow-fill-in aufgefüllt, mit KpnI nachgeschnitten und das den zwischen den Positionen -1609 und -1312 liegenden Promotorbereich enthaltende Fragment in pT81 subkloniert. Dazu wurde das Plasmid pT81 zuerst mit XhoI verdaut, der 5'-Überhang durch Klenow-fill-in aufgefüllt und mit KpnI nachgeschnitten.

**-715/+45 fos-luc** (zur Verfügung gestellt von M. Göttlicher): Enthält die bis zu den unterschiedlichen Positionen angegebenen Bereiche des humanen c-fos Promotors, die vor das Luziferase Reporter gen kloniert wurden

## **Expressionsplasmide für:**

(zur Verfügung gestellt von M. Göttlicher, soweit nicht anders vermerkt)

**ubi-Renilla:** c-DNA kodierend für die Renilla-Luziferase kloniert hinter den UbiquitinC-Promotor

**pSG-GAL4-ELK-1:** Enthält die Transaktivierungsdomäne von ELK-1 (Aminosäurepositionen 83-428). Vollständige cDNA von ELK-1 fusioniert an die DBD des Hefetranskriptionsfaktors GAL4 im Vektor pSG5 (Kortenjann *et al.*, 1994).



## 2.7 Verwendete Antikörper

Kaninchen-anti Rb (C-15), Kaninchen-anti Kip1(MAb F8), Kaninchen-anti ERK1 (K23), Kaninchen-anti Zyklin D1 (H-295) , Ratten-anti-Zyklin D3 (18B6-10), Kaninchen-anti Zyklin E (M20) , Ziegen-anti CDK2 (M2), Ziegen-anti CDK4 (H-22), anti p38 (C-20), wurden von Santa Cruz, Heidelberg bezogen.

Anti Zyklin D2 wurde von Neomarker bezogen.

Anti AhR wurde von Affinity Bioreagents/ Alexis, Grunberg bezogen.

Anti phospho-JNK (#9810), anti phospho-ERK (#9101), anti phospho-p38 (#9211), anti phospho-CREB (#9191), anti phospho-ATF-2 (#9221), anti phospho-SEK (#9151), anti phospho-MKK3/6 (#9231) wurden von NEB, Schwalbach, Taunus bezogen.

Anti-Kaninchen HRP bzw. anti-Maus HRP bzw. anti-Ratten HRP wurden von DAKO, Hamburg bezogen.

## 3 Methoden

### 3.1 Behandlung von Nukleinsäuren

#### **Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Nukleinsäuren wurden in geeigneter Weise mit Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Die Extinktion bei 280 nm zeigt Verunreinigung durch Proteine an. Das Verhältnis  $E_{260}$  zu  $E_{280}$  sollte für DNA etwa zwischen 1,8 und 2 sein.

Eine Extinktion bei 260 nm von 1 entspricht 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA bzw. 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA.

#### **Phenol/Chloroform-Extraktion**

Zur Reinigung DNA-haltiger Lösungen von Proteinen wurde das Volumen mit Wasser auf ein Mindestvolumen von 100  $\mu\text{l}$  gebracht. Nach Zugabe des gleichen Volumens Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und gutem Mischen wurden die Phasen durch 5 min Zentrifugation bei 15000g getrennt; die obere, wäßrige Phase wurde abgenommen und noch einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert.

#### **Konzentration von DNA aus wässrigen Lösungen**

Die DNA-haltige Lösung wurde mit 3 M NaAcetat, pH 4,8 (oder 5 M NaCl) bis zu einer Endmolarität von etwa 0,3 (oder 0,1) M versetzt. Nach Zugabe des 2,5-fachen Volumens Ethanol wurde 20 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  oder für 2h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt und anschließend 10 min bei 15000g zentrifugiert. Zur Entfernung von Salzresten wurde der Niederschlag mit 70% Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet.

### 3.2 Präparation von DNA

#### **Präparation großer Mengen Plasmid-DNA („Maxipräp“)**

Die Präparation wurde nach dem Protokoll zur Isolierung von Plasmid-DNA mittels Quiagensäulen der Firma Diagen durchgeführt.

Mit dem entsprechenden Plasmid transformierte Bakterien wurden über Nacht in 250 ml Selektionsmedium bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und dann 15 min bei 4000g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml Puffer 1 (50 mM Tris/HCL, 10 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen und nach Zugabe von RNaseA (Endkonz. 50-100  $\mu\text{g/ml}$ ) etwa 5 min bei Raumtemperatur belassen; anschließend wurden 10 ml Puffer 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur und gleichzeitigem vorsichtigem Schwenken der Suspension wurden 10 ml Puffer 3 (2,6 M KAc, pH 4,8) dazugegeben,



anschließend wurde die Suspension bei 15000g zentrifugiert; der Überstand wurde filtriert und schließlich auf eine mit 10 ml Puffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7,0, 15% Triton X-100) äquilibrierte Qiagen-tip-500 Säule gegeben. Nach Durchfluß des Überstandes wurde die Säule zweimal mit 30 ml Puffer QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7,0) gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF (1,25 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 8,2) eluiert. Durch Zugabe von 10,7 ml Isopropanol wurde die DNA aus der Lösung gefällt, das Präzipitat bei 13000g abzentrifugiert und nach Waschen mit 70%igen Ethanol an der Luft oder im Vakuum getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

### **Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA („Minipräp“)**

#### **(A) Phenol/Chloroform-Methode:**

Die Bakterien wurden in 3 ml Selektionsmedium über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml dieser Bakterienkultur wurden 1 min bei 12000g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und der Niederschlag in dem verbleibenden Volumen (ca. 100 µl) resuspendiert. Anschließend wurden 50 µl Phenol/Chloroform (1:1) zugegeben, die Suspension gemischt und für 5 min bei 12000g abzentrifugiert. Von der oberen, wässrigen Phase wurden 40 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 5 M NaCl der Salzgehalt auf ca. 0,3 M eingestellt. Nach Hinzufügen des 2-fachen Volumens Ethanols wurde die DNA/RNA 30 min bei RT gefällt. Danach wurde bei 12000g abzentrifugiert und das Präzipitat an der Luft getrocknet. Die DNA/RNA wurde in 50 µl Wasser aufgenommen.

#### **(b) Wizard Mini-prep kit (Promega)**

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA, die anschließend sequenziert werden sollte, wurden wie unter (A) Bakterien pelletiert. Das so erhaltene Bakterienpellet wurde nach Herstellerangaben in den geeigneten Puffern resuspendiert, lysiert und zuletzt neutralisiert. Die sich im Überstand befindende Plasmid-DNA wurde unter Verwendung der vom Hersteller zur Verfügung gestellten DNA-bindenden Säulen aufgereinigt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 50 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

### **3.3 Klonierungstechniken**

#### **Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen**

Für den Verdau von 0.5-1 µg DNA wurden, abhängig vom jeweiligen Enzym und von den Pufferbedingungen, 2 bis 4 Enzymeinheiten (eine Enzymeinheit entspricht der Enzymmenge, die benötigt wird um in einer Stunde 1 µg Lambda-DNA vollständig zu verdauen) verwendet; das Verdauvolumen betrug mindestens das 10-fache der zugesetzten Enzym/Glycerinlösung (für einen analytischen Verdau: 10 µl, präparativen Verdau: bis 100 µl). Verdaut wurde 2-3 Stunden oder über Nacht bei 37°C. Bei mit RNA verunreinigter Plasmid DNA aus Minipräparationen wurde der Reaktion 0,5 µg/µl RNaseA zugesetzt. Der Verdau wurde durch Zugabe von 5x Ladepuffer (50% Glycerin, 50 mM EDTA, pH 8.0, 2% SDS, je 1 mg/ml Bromphenolblau und Xylencyanol) abgestoppt und auf einem Agarosegel aufgetrennt.

#### **Ligation von DNA-Fragmenten**

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden in einem drei- bis fünffachen molaren Überschuß mit dem entsprechend geschnittenen Vektor gemischt. Danach wurde durch Zugabe von 1 Einheit T4-DNA-Ligase und 1 µl 10xLigasepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM ATP) in einem Endvolumen von 10 µl ligiert (über Nacht, bei 15°C).

#### **Auffüllen von 5'-Überhängen (Klenow-Fill-in)**

Die verdauten und anschließend isolierten DNA-Fragmente wurden für 20 min bei 30°C in einem Gesamtvolumen von 40 µl in Gegenwart von 33 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und Zugabe von 10 U Klenow-Polymerase in geeignetem Puffer (Eco-Pol. Puffer, NEB, Schwalbach, Taunus) inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch 10 min Inkubation bei 75°C abgestoppt und die DNA mittels Ethanol gefällt.

### **3.4 Transformation von kompetenten Bakterien**

#### **Präparation von kompetenten Bakterien**

4 ml einer Übernachtskultur von E. coli DH5α wurde zu 400 ml LB-Medium gegeben und bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 bis 0,35 wachsen gelassen; dann wurden die Bakterien auf zwei neue Gefäße verteilt und für 10 min auf Eis gestellt, anschließend bei 800g und 4°C für 10 min zentrifugiert und der Bakterienniederschlag mit je 20 ml eiskaltem 0.1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und die Suspensionen für weitere 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Resuspension in eiskaltem 0.1 M CaCl<sub>2</sub> und die anschließende Zentrifugation noch zweimal wiederholt und der Bakterienniederschlag in 2 ml eiskaltem 0.1 M

CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Die Bakterienlösung wurde auf Eis inkubiert und daraus Aliquots (50 µl) kurz in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -70°C aufbewahrt.

### **Transformationsmethoden**

#### **(A) chemische Transformation:**

100 µl kompetente Bakterien wurden mit 5 µl des Ligationsansatzes oder 5 ng Plasmid-DNA vorsichtig gemischt und 20 min auf Eis gestellt; anschließend wurde die Bakteriensuspension für 90 sec. bei 42°C inkubiert und sofort wieder auf Eis gestellt; dann wurde 400 µl Bakterienmedium (LB, NB ohne Ampicillin) zu den Bakterien gegeben und für 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde nach Zentrifugation das Bakterienpellet in 200 µl Überstand resuspendiert und auf Selektivagarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und ein Teil der gewachsenen Bakterienklone für DNA-Präparation verwendet.

#### **(B) Elektroporation:**

40 µl elektrokompente Bakterien (Invitrogen BV, Niederlande) wurden mit 1-2 µl des Ligationsansatzes vorsichtig gemischt und in Eis gekühlte Elektroporationsküvetten (0,1 cm Spaltbreite, BioRad) überführt. Nach der Elektroporation (1,8 kV Puls, Gene Pulser BioRad) wurde die Bakteriensuspension umgehend in 1 ml SOB-Medium resuspendiert und für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Bakterienpellet in 200 µl Überstand resuspendiert und auf Selektivagarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und ein Teil der gewachsenen Bakterienklone für DNA-Präparation verwendet.

## **3.5 Elektrophoretische Auftrennung und Isolierung von DNA**

### **Auftrennung auf Agarosegelen**

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 0,8-2% Agarose in 50 ml 1xTAE-Puffer durch Erhitzen im Mikrowellenherd gelöst. Der Gellösung wurden 2 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zugesetzt, bevor sie in die Gelapparatur gegossen wurde. Mit Hilfe eines Kammes wurden Taschen für die aufzutragenden Proben ausgespart. Nach Erhärten der Agarose, Herausziehen des Kammes und Beschicken der Gelapparatur mit Elektrodenpuffer (1xTAE) wurde diese an die Elektroden angeschlossen. Die Proben wurden in DNA-Probenpuffer in die Taschen geladen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Feldstärke von 5-15 V/cm.

## **Extraktion von DNA Fragmenten aus Gelen**

### **(A) Elektrophoretische Isolation:**

Nach Identifizierung der interessierenden DNA-Bande unter UV-Licht wurde mit einem Skalpell unmittelbar vor bzw. hinter der Bande in einer Breite, welche der DNA-Bande entsprach, in das Agarosegel eingeschnitten und ein Stück DEAE-Papier (NA45) geeigneter Größe in den Spalt eingeführt; zwischen Membran und Gel durfte sich dabei keine Luftblasen mehr befinden; dann wurde Spannung angelegt (wenn der Schnitt oberhalb der Bande gesetzt wurde, erfolgte vorher eine Umpolung) und nach einigen Minuten unter UV-Licht geprüft, ob die DNA an die Membran gebunden hat; war dies der Fall, wurde die Membran in ein neues Reaktionsgefäß mit 100 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1,5 M NaCl) überführt und die DNA für 30 min bei 65°C von der Membran eluiert. Nach Entfernen der Membran wurde das Eluat mit 100 µl H<sub>2</sub>O verdünnt und die Nukleinsäuren durch Zugabe von 400 µl Ethanol gefällt.

### **(B) Isolation mittels EasyPure Kit (Biozyme)**

(Die vom Hersteller bereitgestellten Lösungen sind in Klammern in kursiver Schreibweise angegeben.)

Nach Isolation der DNA aus dem Agarosegel (wie unter (A) beschrieben) wurde das Gelstück gewogen. Bezogen auf die erhaltene Grammzahl wurde das dreifache Volumen an Puffer (*Salt*) hinzugegeben. Das Gelstück wurde durch Inkubation bei 56°C geschmolzen. Die DNA wurde an eine Matrix (*Bind*) gebunden und durch Zentrifugation bei 13000g für 5 s pelletiert. Nach der Resuspension des Niederschlags in der Waschlösung (*Wash*), erneuter Zentrifugation bei 13000g für 5 s wurde die Matrix an der Luft getrocknet. Durch 5 min Inkubation in 20 µl H<sub>2</sub>O wurde die DNA von der Matrix gelöst. Zur Entfernung der Matrix wurde für 5 min bei 13000g zentrifugiert und der DNA-haltige Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

## **3.6 Zellkultur**

### **Kultivieren und Trypsinieren von Zellen**

Alle Zellen wurden bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Feuchte kultiviert. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin von der Kulturschale abgelöst und mit geringerer Dichte wieder ausgesät (passagiert). Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und anschließend 1 ml 0,25% Trypsinlösung zugegeben. Nach kurzer Einwirkzeit wurden die nun abgelösten Zellen in Medium resuspendiert und auf neue Kulturschalen verteilt.

## **Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren wurde die Zellsuspension 3 min bei 300g zentrifugiert und der Niederschlag in kaltem Einfriermedium (Kulturmedium mit 10% DMSO) zu ca.  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml aufgenommen. Je 1 ml wurde in Einfrierröhrchen abgefüllt und 1 h auf Eis gestellt. Nach mind. 12 h bei  $-80^\circ\text{C}$  wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff bis zur Verwendung aufbewahrt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte rasch durch Aufwärmen in der Hand. Danach wurde die Zellsuspension in frischem Medium aufgenommen und auf Platten ausgesät. Nach etwa einem Tag wurde das Medium gewechselt.

## **3.7 Transfektion von eukaryontischen Zellen**

### **3.7.1 transiente Transfektion**

#### **Elektroporation**

In 15 cm Kulturschalen gewachsene 40-60% konfluente Zellen wurden trypsiniert, in 6-10 ml DMEM mit 10% FCS resuspendiert und bei 50g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen zweimal in 10 ml DMEM ohne FCS gewaschen und bei 50g abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in DMEM ohne FCS so aufgenommen, daß die Endkonzentration ca.  $2,5 \times 10^7$  Zellen pro ml Medium betrug. 200  $\mu\text{l}$  (ca.  $5 \times 10^6$  Zellen) wurden mit den entsprechenden Plasmiden gemischt und die Suspension in eine Elektroporationsküvette überführt (d= 0,4 cm). Nach der Elektroporation (270 mV Puls bei einer Kapazität von 500  $\mu\text{F}$ , BioRad gene pulser) wurden die Zellen für 10 min bei RT inkubiert und in 10 ml DMEM-Medium resuspendiert. Wurden n-Behandlungen durchgeführt, wurden entsprechend n-Elektroporationen durchgeführt und die resuspendierten Zellen anschließend vereinigt. Danach wurden die elektroporierten Zellen auf n-Kulturschalen (9 cm Kulturschalen) verteilt.

Nach 1-4 h wurden die entsprechenden Behandlungen durchgeführt.

#### **TFX-50 (Promega, Mannheim) vermittelte Transfektion**

24 h vor der Transfektion wurden  $1,25 \times 10^5$  Zellen pro Einheit („well“) in einer 24-well-Platte kultiviert. 1  $\mu\text{g}$  der zu transfizierenden Plasmide wurde mit 1,75  $\mu\text{g}$  der kationischen und zugleich lipophilen Substanz TFX-50 (Promega, Mannheim) in 200  $\mu\text{l}$  DMEM ohne FCS gemischt. Das DNA/TFX-50 Gemisch wurde für 10 min bei RT inkubiert und auf die zuvor einmal mit DMEM ohne FCS gewaschenen Zellen transferiert. Nach 1 h Inkubation im Brutschrank wurden den Zellen 1 ml Medium hinzugefügt. Die Behandlung mit Induktoren erfolgte entweder 1 h oder 14 h nach Mediumzugabe.

### **Behandlung der Zellen mit verschiedenen Substanzen**

Die verwendeten Substanzen wurden zuerst in Medium gelöst und anschließend zu einer bestimmten Endkonzentration z.B.  $1 \times 10^{-9}$  M für TCDD bzw. 0,1% für DMSO den zu behandelten Zellen zugesetzt.

#### **3.7.2 stabile Transfektion**

In 15 cm Kulturschalen gewachsene 40-60% konfluente Zellen wurden mittels Elektroporation wie oben beschrieben mit 5 µg stabil zu integrierendem Plasmid und 0,5 µg pSV2neo elektroporiert. 14-16 h danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in G418-haltigen Standardkulturmedium (1 mg G418/ml) weiter kultiviert. Einzelne Klone wurden durch Trypsinieren isoliert und zunächst auf 24-well-Platten transferiert. Die subkonfluent gewachsenen Klone wurden dann auf 9 cm Kulturschalen weiterkultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen trypsinisiert, die Hälfte der Zellen eingefroren und die restlichen Zellen auf zwei 15 cm Kulturschalen verteilt. Nachdem die Zellen zu 40-60% konfluent waren, wurde je eine Kulturschale mit DMSO (0,1%) bzw. TCDD (1 nM) behandelt und 24 h oder 48 h später die *Firefly*-Luziferase-Aktivität der behandelten Zellen bestimmt.

### **3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry *et al.* (1951). Für das Erstellen einer Eichkurve wurden 0, 10, 20, 30, 40 und 50 µl einer BSA-Stammlösung (1 mg/ml) mit Lowry-Reagenz I (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1 M NaOH) auf 500 µl aufgefüllt. Von den Proteinextrakten wurden je 5 µl mit 495 µl Lowry-Reagenz I gemischt. Nach Zugabe von 1 ml Lowry-Reagenz IV (100 Volumen Lowry-Reagenz I, 1 Volumen 2% Na-K-Tartrat, 1 Volumen 1% CuSO<sub>4</sub>) wurden die Proben 10 min bei Raumtemperatur und im Dunkeln stengelassen. Danach wurden unter sofortigem Mischen 100 µl Folin-Ciocalteus Phenolreagenz/Wasser (1:1) zugegeben. Nach 5 min Inkubation im 37°C Wasserbad (im Dunkeln) wurden jeweils 300 µl der Proben in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion bei 600 nm gegen einen Leerwert ohne Protein gemessen. Anhand der Eichkurve wurde die Proteinmenge in den Proben bestimmt.

### 3.9 Enzymtests

#### **Firefly-Luziferase-Aktivitätsbestimmung**

Die Zellen wurden nach der Transfektion mit PBS (ohne Ca/Mg) gewaschen. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und 200 µl Lysis-Puffer (0.1M Tris-acetate, pH 7.5, 2mM EDTA, 1% Triton-X-100) zugegeben. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert, abgeschabt und in ein vorgekühltes Eppendorf-Gefäß überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei 13000g wurden aus dem Überstand 50-100 µl Lysat zur Messung entnommen. Diese erfolgte in einem Luminometer (Berthold, Wildbad) unter Zugabe von autoinjizierter Luziferinreaktionslösung (in GlyGly-Puffer 1:5 verdünnte Luziferinlösung) und Reaktionslösung (GlyGly-Puffer, 1 mM DTT, 1 mM ATP).

#### **Messung der *Renilla*-Luziferase- und der *Firefly*-Luziferase-Aktivität aus dem selben Zellextrakt (Matthews *et al.*, 1977)**

Die Zellen wurden nach der Transfektion mit PBS (ohne Ca/Mg) gewaschen. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und 200 µl Lysis-Puffer (*passive lysis buffer*, Promega, Mannheim) zugegeben. 100 µl Lysat wurden zur Bestimmung der Firefly-Luziferase-Aktivität entnommen und wie oben beschrieben analysiert. Zur Bestimmung der Renilla-Luziferase-Aktivität wurden 10 ml Lysat mit 390 µl Reaktionspuffer und 100 µl 5xSubstratlösung gemischt. Nach Mischen der Suspension wurde die Lumineszenz im Luminometer (Berthold, Wildbad) gemessen.

### 3.10 Western-Blot

#### **SDS-PAGE (Laemmli, 1970)**

Die Polyacrylamidgele bestanden aus einem 8-12% Trenngel und einem 5% Sammelgel, die in eine Minigelapparatur (Hofer) gegossen wurden. 15 ml einer 8% Trenngel-Lösung bestanden aus 7 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, 4 ml Acryl/Bisacrylamid (30:0,8), 3,8 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 150 µl 10% SDS die durch Zugabe von 150 µl 10% APS und 9 µl TEMED polymerisiert wurden. Das Gel wurde bis 1-2 cm unterhalb des Kammes gegossen und bis zum Auspolymerisieren mit Wasser oder Isopropanol überschichtet. Für 3 ml einer Sammelgellösung wurden 2,1 ml H<sub>2</sub>O, 0,5 ml Acryl/Bisacrylamid (30:0,8), 0,38 ml 1,0 M Tris-HCl, pH 6,8, 30 µl 10% SDS, 30 µl 10% APS und 3 µl TEMED verwendet. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und der Kamm eingesetzt. Die Auftrennung der Proben erfolgte in 1xLaemmli-Laufpuffer bei 20 mA bis die Proben das Trenngel erreicht hatten, und dann bei 30 mA bis die Bromphenolblau-Bande das Ende des Gels erreichte. Zur Grössenbestimmung wurde ein Proteinmarker (SDS 7B, Sigma) mitgeführt.

## Western-Blot

Die Transfermembran (Millipore Immobilon-P-Transfer) wurde auf die Größe des Proteingels zurechtgeschnitten, in Methanol getränkt, 2 min in Wasser geschwenkt und anschließend 5 min in Transferpuffer äquilibriert. 3MM-Papier und das Trenngel wurden in Transferpuffer befeuchtet. Danach wurde das Gel nach folgendem Schema in eine "semidry"- oder "wet"-Blotapparatur (Biorad) eingespannt:

Blotaufbau:           Anode  
                  3 Lagen 3MM Papier (in Transferpuffer befeuchtet)  
                  Transfermembran für Proteine (10 min in 100% Methanol aktiviert)  
                  Trenngel  
                  3 Lagen 3MM Papier (in Transferpuffer befeuchtet)  
                  Kathode

Der "semidry"-Blot wurde bei 60 bzw. 120 mA (bei einer Membranfläche von ca. 50 bzw. 100 cm<sup>2</sup>) für 40 min und max. bei 25V durchgeführt. Der "wet"-Blot wurde bei 250-350 mA (bei einer Membranfläche von ca. 50-100 cm<sup>2</sup>) und 4<sup>0</sup>C über Nacht durchgeführt.

Nach dem Blot wurde die Membran in 5-10% Magermilchpulver in TBST-Puffer geblockt. Nach Waschen in TBST-Puffer, wurde die Membran in Folie eingeschweißt und 1-4 h mit dem ersten Antikörper (1:1000 bis 1:200 in 5-10% Magermilchpulver in TBST-Puffer) bei ständigem Schwenken und Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 3x5 min in TBST-Puffer gewaschen, die Membran wieder in Folie eingeschweißt, und mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Anti-Kaninchenoder Anti-Maus-IgG-Antikörper (1:2000 in TBST-Puffer) inkubiert. Danach wurde die Membran 3x5 min in TBST-Puffer gewaschen.

Wurden phospho-spezifische Antikörper (NEB, Schwalbach, Taunus) verwendet, wurde die Membran nach der Blockierung unspezifischer Bindestellen dreimal 5 min in TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte in 0,3% BSA/TBST über Nacht bei 4<sup>0</sup>C.

Wurde der AhR-Antikörper verwendet, wurde die Membran in 3% BSA/PBST blockiert. Das Waschen erfolgte unter Verwendung von PBST. Die Inkubation sowohl des primären als auch des sekundären Antikörpers erfolgte in 0,1% BSA/ PBST.



### **Detektion von Protein/Antikörperkomplexen**

Die Membran wurde auf eine Glasplatte gelegt, mit Westernblot-Detektionsreagenz („ECL-Western blotting detection reagents“ von Amersham) überschichtet und nach 1 min Inkubation in der Dunkelkammer bis zu 2h auf einem Röntgenfilm exponiert. Bei der Reaktion der antikörpergekoppelten Peroxidase mit den Reagentien wird Chemolumineszenz erzeugt, welche den Film schwärzt.

### **Probenerstellung für SDS-PAGE**

Die Zellen wurden einmal in PBS gewaschen und in 2xLaemmli-Probenpuffer lysiert. Das Zellysate wurde anschließend zur Scherung der DNA sonifiziert (mittels eines Branson sonifier). Vor Auftragen der Proben wurden diese 5 min bei 95°C inkubiert.

### **Bestimmung des Proteingehalts durch Coomassie-Blau-Färbung**

Ein Teil des Gels wurde vor der Western-Blot-Analyse entfernt und in Coomassie-Färbelösung für 0,5-14 h inkubiert. Das Gel wurde durch Inkubation in zunächst 50% Methanol und 10% Essigsäure und anschließend in 5% Methanol und 7% Essigsäure entfärbt. Zuletzt wurde das Gel im Vakuum-Trockner bei 80°C getrocknet.

## **3.11 RNA-Präparation**

### **Isolation von Gesamt-RNA**

Halbkonfluente bis konfluente auf einer 9 cm Kulturschale gewachsene Zellen (ca.  $3-6 \times 10^6$ ) wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und durch tropfenweise Zugabe von 550 µl Gesamt-RNA-Lysispuffer aufgeschlossen. Das Lysat wurde in ein auf Eis vorgekühltes Eppendorf-Gefäß überführt, 60 µl 3 M Natriumazetat pH 4,2 zugegeben und gemischt. Danach wurde 550 µl „saures Phenol“ (pH 4,0) hinzugefügt und die Lösung für 30 s kräftig gemischt. Nach der Zugabe von 150 µl Chloroform und erneutem Mischen wurde die Suspension 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 13000g 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und durch Zugabe des gleichen Volumens an Isopropanol wurde die RNA bei -20°C für 30 min gefällt. Nach Zentrifugation bei 13000g für 10 min wurde das Präzipitat in 200 µl Gesamt-RNA-Lysispuffer resuspendiert und durch Zugabe von 200 µl Isopropanol erneut bei -20°C für 30 min gefällt. Nach erneuter Zentrifugation bei 13000g für 10 min wurde das Präzipitat in 75% Ethanol gewaschen und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 13000g wurde das Präzipitat an der Luft getrocknet. Zuletzt wurde die RNA-Konzentration bestimmt und die Proben bei -80°C aufbewahrt.

### **PolyA<sup>+</sup>-Präparation**

Halbkonfluente bis konfluente auf einer 15 cm Kulturschale gewachsene Zellen (ca.  $1-2 \times 10^7$ ) wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und durch Zugabe von 10 ml Proteinase K-haltigem STE-SDS-Puffer (300µg/ml) lysiert. Nach Zerkleinern der genomischen DNA mittels Ultraturax (Janke & Kunkel, Staufen) für 10 s bei halber Leistung wurde die Suspension zum Verdau der Proteine für 30 min bei 37°C inkubiert. Dazu wurde 1 ml 5 M NaCl gegeben (Endkonzentration der Lösung 0,5 M). Danach wurden 100-200 mg Oligo-dT-Zellulose (Typ VII, Pharmacia Biotech; suspendiert in HSB) zugegeben und bei RT über Nacht unter Drehen inkubiert. Die Oligo-dT-Zellulose-Suspension wurde in eine Bio-Rad Econo-Pac Säule gegossen und die durch einen Filter zurückgehaltene Oligo-dT-Zellulose 3x mit je 10 ml HSB gewaschen. Zur Elution der RNA wurde die Oligo-dT-Zellulose 5 ml autoklaviertem Wasser inkubiert und dieses anschließend in einem Corex-Glasröhrchen gesammelt. 400 µl des Eluates wurden in einem Reaktionsgefäß kurz bei 12000g zentrifugiert und die OD<sub>260nm</sub> bestimmt (OD=1 entspricht 40 µg RNA/ml). Danach wurden zur Fällung der RNA 4,6 ml des Eluates mit 500 µl 3 M NaAc, pH 5,2 (Endkonzentration der Lösung 0,3 M) und 12,5 ml Ethanol (2,5Vol.) für 2h bei -20°C inkubiert. Die RNA wurde durch Zentrifugation bei 10000g (4°C, 45 min) präzipitiert, einmal in 75% Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die RNA wurde anschließend in autoklaviertem Wasser zu einer Endkonzentration von 0,75 µg/µl aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

### **3.11 a Radioaktive Markierung von DNA für die Northern-Blot-Analyse**

Bis zu 25 ng der aus verschiedenen Plasmiden isolierten DNA-Fragmente wurden mit Wasser zu einem Gesamtvolumen von 45 µl aufgefüllt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Lösung wurde in ein *redi-Prime*-Reaktionsgefäß (*redi Prime kit*, Amersham, Life Science) überführt und 5 µl α<sup>32</sup>P-dCTP (3000Ci/mmol; 10mCi/ml) hinzugefügt.

Die Reaktion wurde für 10-15 min bei 37°C inkubiert und danach wurde die radioaktiv markierte Sonde mit einer Sephadex G-50-Säule (Nick-Column, Pharmacia) gereinigt.

### **3.11 b Northern-Blot-Analyse**

10-20 µg Gesamt-RNA oder 2-10 µg polyA<sup>+</sup>-RNA, die in 13,5 µl Wasser gelöst waren, wurden 27 µl Ethidium-Bromid -haltiger Denaturierungspuffer (0,1mg/ml) zugesetzt. Nach Mischen der Lösung wurde die RNA 10 min bei 55°C denaturiert und dann auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 5 µl RNA-Ladepuffer zugegeben und die RNA-Proben auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Zur Anfertigung des Agarosegels wurde 1% Agarose in MOPS-Laufpuffer gelöst und die Suspension autoklaviert. Nach Erwärmen der Agarose/MOPS-Suspension auf ca. 60°C wurde zu einer Endkonzentration von 1% Formaldehyd zugesetzt. Nach Laden der Proben wurden die RNA in einer Gelkammer elektrophoretisch in Gegenwart von 1xMOPS-Laufpuffer aufgetrennt (ca. 1-3h, 80-100V). Danach wurde das Gel unter der

UV-Lampe photographiert um die Intaktheit der RNA an Hand der sichtbaren Banden der 18S-rRNA und 28S-rRNA abzuschätzen. Auf das Gel wurde eine Nylonmembran („Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup>“, Amersham) gelegt und mittels Kapillarkraft die RNA in Gegenwart von 10xSSC über Nacht auf die Membran transferiert. Zur kovalenten Fixierung der RNA auf der Membran wurde diese zunächst mit 5xSSC gewaschen und anschließend mit UV-Licht bestrahlt (120 mJ, UV-Stratalinker, Stratagene). Anschließend wurde die Membran in einer Glasröhre bei 65°C in einem Hybridisierungssofen (Amersham Buchler GmbH, Braunschweig) für 15 min in 5-10 ml Vorhybridisierungslösung rotiert. Der Vorhybridisierungslösung wurde Hering-Sperma-DNA zum Absättigen unspezifischer Bindestellen zu einer Endkonzentration von 20 µg/ml zugesetzt und die Membran für weitere 45 min inkubiert. Danach wurde die Membran in 5-10 ml Hybridisierungslösung bei 65°C für zunächst 15 min inkubiert und anschließend ca. 10<sup>6</sup> cpm/ml radioaktiv markierte und zuvor in Gegenwart von 20 µg/ml Hering-Sperma-DNA für 5 min bei 95°C denaturierte Sonde hinzugefügt. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C über Nacht. Anschließend wurde die Membran einmal in Waschlösung 1 und dann zweimal in Waschlösung 2 bei 65°C für 30 min gewaschen, in Folie eingeschweißt, auf dem Phosphoimager quantifiziert und ein Röntgenfilm zur Autoradiographie aufgelegt.

### **3.12 Messung der Transkriptionsrate durch die „Nuclear-run-off“-Analyse**

#### **Immobilisierung von DNA-Fragmenten auf einer Hybond-N<sup>+</sup>-Membran durch die „Slot-Blot“-Methode**

Eine Hybond-N<sup>+</sup>-Membran wurde in Wasser befeuchtet und zusammen mit einem in 10xSSC getränkten 3MM-Papier in einer „Slot-Blot“-Kammer (Schleicher&Schuell, Dassel) fixiert. 200-500 ng DNA wurde in 30 µl TE-Puffer zusammen mit 20 µl Ladepuffer (0,3 M NaOH, 15% Ficoll 400, 0,1% Bromphenolblau) gemischt. Die DNA-Lösung wurde durch die Membran gesaugt und die zurückbleibende DNA zweimal mit 300 µl 0,3 M NaOH gewaschen. Nach kurzem Schwenken der Membran in 5xSSC wurde diese an der Luft getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (im UV stratalinker 2400, Stratagene) an die Membran gekoppelt.

#### **„Nuclear-run-off“-Analyse**

Auf einer 15 cm Kulturschale 40-80% konfluent gewachsene Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und in 5 ml PBS gesammelt. Zum späteren Vergleich mit den lysierten Zellen wurden 100 µl Zellsuspension abgenommen. Die Zellen wurden bei 300-400g abzentrifugiert und in 4 ml NP40-Lysispuffer resuspendiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden die Zellkerne 5min bei 400g abzentrifugiert, in 4 ml NP40-Lysispuffer gewaschen und ein Aliquot unter dem Mikroskop mit den intakten Zellen verglichen. Nach der kompletten Lyse der Zellen

wurden die so erhaltenen Zellkerne in 100 µl run-off-Einfrierpuffer resuspendiert und in flüssigen Stickstoff oder bei -80°C aufbewahrt.

Die bei RT aufgetauten Zellkerne (100 µl) wurden mit 100 µl run-off-Reaktionspuffer gemischt und für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde wie für die Isolation von Gesamt-RNA beschrieben die RNA isoliert. Die Hybridisierungen mit den auf Hybond-N<sup>+</sup>-Membranen immobilisierten DNA-Fragmenten (siehe oben) erfolgten wie für die Northern-Blot-Analyse beschrieben. Zur Hybridisierung wurden 1-4x10<sup>6</sup> cpm/ml über eine Dauer von 36 h eingesetzt. Danach wurden die Membranen ebenso wie für die Northern-Blot-Analyse beschrieben gewaschen, in Folie eingeschweißt, auf dem Phosphoimager quantifiziert und ein Röntgenfilm zur Autoradiographie aufgelegt. Bei starkem Hintergrundsignal wurden die Membranen noch einmal mit Waschlösung 1, der 10 µg/ml RNaseA (DNase frei gemacht durch 15 min Inkubation bei 95°C) zugesetzt wurde, für 30 min bei 37°C inkubiert und erneut exponiert.

### 3.13 Sequenzierung von Plasmid-DNA

( $\alpha$ -<sup>33</sup>P-ddNTP Methode unter Verwendung des Thermo-Sequenase-Kits, Amersham)

Ungefähr 0,5 µg Plasmid-DNA wurden zusammen mit 1-2,5 pmol der passenden Primer (M13-Forward oder -Reverse bzw. T7 oder T3 Universal-Primer) gemischt und mit 8 U Thermo-Sequenase-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 20 µl inkubiert. Davon wurden je 4,5 µl zu einem das entsprechende  $\alpha$ -<sup>33</sup>P-ddNTP (ddGTP, ddATP, ddTTP und ddCTP) enthaltendem Gefäß gegeben und die Reaktion in einer Perkin Elmer 9600 PCR Maschine unter den folgenden Bedingungen inkubiert: Denaturierung bei 95°C, 30 s; Annealing: 55°C, 30 s und Elongation 72°C, 1 min; Gesamtzahl der PCR-Zyklen: 35. Nach Zugabe von 4 µl Stop-Lösung wurden vom Gesamtvolumen 3 µl auf einem denaturierenden Polyacrylamid/Harnstoff-TBE-Gel, das zur Erwärmung zuvor für 30 min bei 1500 V in 1 x TBE-Puffer inkubiert wurde, in 1 x TBE-Puffer, bei 1500 V aufgetrennt. Das Gel wurde auf 3MM Papier für 2 h bei 80°C getrocknet und über Nacht bei RT gegen einen Röntgenfilm exponiert.

### 3.14 DNA-Färbung von eukaryontischen Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen wurden einmal mit PBS (-Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) gewaschen, trypsiniert und in DMEM mit 10% FCS aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 250g für 5 min wurden die Zellen in PBS gewaschen und in 2 ml PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 2 ml Fixierungslösung wurden die Zellen 10 min bei RT inkubiert. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden 400 µl 0,5% Tween 20 zugegeben und die Zellsuspension für weitere 10 min inkubiert. Anschließend wurden 10 ml eiskaltes PBS/5% FCS hinzugefügt und die Zellen bei 800g zentrifugiert. Zur DNA-Färbung wurden die Zellen in PBS/5% FCS, das den DNA-

Bisbenzimid Farbstoff H33258 (Hoechst, Frankfurt) in einer Endkonzentration von 1 µg/ml enthielt, resuspendiert.

### **3.15 Messung des DNA-Gehalts pro Zelle mittels der Durchflußzytometrie**

Die Zellen wurden im Durchflußzytometer (FACS Star Plus) unter Verwendung eines Argon-Lasers zur Messung der Fluoreszenz des DNA-Bisbenzimid Farbstoff H33258 (Hoechst, Frankfurt) bei  $425\pm 22$  nm nach Anregung bei 350-360 nm analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels des Analyseprogramms *Cell Quest* (Becton Dickinson).

### **3.16 Gelretardationsanalyse zum Nachweis von DNA-bindenden Proteinen („Band-Shift“)**

#### **Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA mittels der „fill-in“-Methode**

Je 5 pMol doppelsträngige DNA („TRE“ oder „XRE“) und 2 µl  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (3000Ci/mmol; 10mCi/ml) wurden mittels der „fill-in“-Reaktion (siehe oben) markiert. Die Probe wurde mittels einer Sephadex-G25-Säule gereinigt.

Die DNA-Bindungsreaktion wurde in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Es wurden 5 µg Protein aus den angefertigten Kernextrakten mit 1 mg poly-(dIdC), 2 mg BSA, 12 mM HEPES-KOH, pH 7,9, 60 mM KCL, 62,5 mM Tris-HCl, pH 7,8, 0,6 mM EDTA, 6% Glycerin und 5 mM DTT für 5 min bei RT inkubiert. Dazu wurden ca. 10 fmol  $^{32}\text{P}$ -markierte doppelsträngige DNA (ca. 25000 cpm) gegeben und die Reaktion weitere 30 min inkubiert. Die Proben wurden durch ein 5% Acrylamid-Gel (30 ml Gel-Lösung: 5 ml Acryl/ Bisacrylamid (30:0,8); 1,5 ml 5 x TBE; 23,5 ml Wasser; 30 µl TEMED, 300 µl APS (10%) bei 100 V für 2 h in 0,25 x TBE aufgetrennt

### 3.17 Immunkomplex-Kinase-Assay zur Cdk2-Aktivitätsmessung (Matsushime *et al.*, 1994)

Etwa  $2 \cdot 5 \cdot 10^6$  Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 500  $\mu$ l Kinase-Lysispuffer resuspendiert und auf Eiswasser 2 mal 5 Sekunden sonifiziert (Branson Sonifier). Anschließend wurden die Extrakte bei 13000g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Vom Überstand wurden 50  $\mu$ l als Zellysat weiter verwendet und die restlichen 450  $\mu$ l mit 20  $\mu$ l Protein-A-Sepharose (in Lysispuffer resuspendiert) gemischt und zur Reinigung der Extrakte von unspezifisch an die Sepharose bindenden Molekülen eine Stunde bei 4°C rotiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 360g bei 4°C wurde zum Überstand 5  $\mu$ l anti-ZyklusE-Antikörper gegeben und für mindestens 4 h oder über Nacht die Lösung bei 4°C rotiert. Anschließend wurden zur Aufreinigung der Immunkomplexe die Extrakte mit 20  $\mu$ l Protein-A-Sepharose versetzt und eine weitere Stunde bei 4°C rotiert. Die Protein-A-Sepharose wurde jeweils bei 360g für 5 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand entfernt und insgesamt zweimal mit Lysispuffer und zweimal mit Kinasepuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand mit einer dünnen Kanüle entfernt und die Protein-A-Sepharose in 25  $\mu$ l Kinase-Puffer, versetzt mit  $^{32}$ P-ATP (10  $\mu$ Ci) und Histon H1 (1  $\mu$ g; Boehringer, Mannheim) aufgenommen. Nach Mischen der Suspension wurde diese für 30 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert und die Reaktion bei 350g 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 25  $\mu$ l 2xLaemmli-Puffer und die Protein-A-Sepharose mit 100  $\mu$ l 2xLaemmli-Puffer versetzt. Ein Teil der aus dem Überstand gewonnenen Extrakte wurde mittels SDS-PAGE auf einem 12% Gel aufgetrennt. Nach Trocknen (bei 80°C für 2 h) wurde das Gel gegen einen Röntgen-Film für mehrere Stunden exponiert. Die Immunopräzipitate wurden ebenso mittels SDS-PAGE auf einem 12% Gel aufgetrennt und mittels Western-Blot-Analyse hinsichtlich der verschiedenen Zellzyklus-Proteine untersucht.

## 4 Ergebnisse

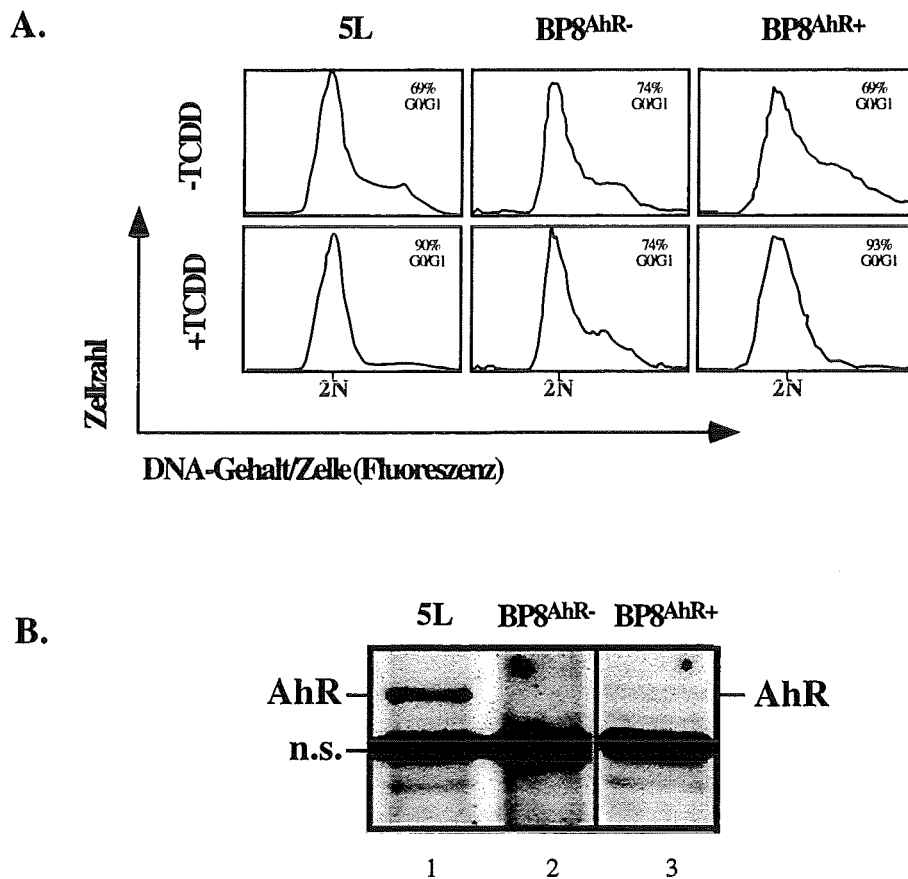
TCDD-Toxizität läßt sich vor allem als Veränderung des Proliferations- oder Differenzierungsverhaltens von Zellen verstehen (Schmidt und Bradfield, 1996; Göttlicher *et al.*, 1998). Der AhR spielt eine zentrale und notwendige Rolle bei der Vermittlung der toxischen TCDD-Effekte (Fernandez-Salguero *et al.*, 1996). Eines der wenigen Modellsysteme um die TCDD-Wirkung auf die Proliferation zu untersuchen sind logarithmisch wachsende 5L-Rattenhepatomzellen, in denen TCDD die Progression von der G1- zur S-Phase schon nach 4 h hemmt (Wiebel *et al.*, 1991; Göttlicher und Wiebel, 1991). Von den 5L Wildtypzellen wurden Klone isoliert, in denen nach TCDD-Behandlung weder das klassische Zielgen des AhR *Cytochrom P450 IAI (Cyp IAI)* induzierbar noch das Wachstum gehemmt ist (BP8- und D1-Zellen; Göttlicher *et al.*, 1990). Weiterhin läßt sich in in diesen Zellen auch ein XRE-abhängiges Reporter gen nicht durch TCDD induzieren (Weiß *et al.*, 1996). Zumindest ein Grund für diese TCDD-Resistenz beruht auf dem Fehlen eines ligandenbindenden AhR (Göttlicher *et al.*, 1990).

### 4.1 Die stabile Expression des AhR in den rezeptordefizienten BP8-Zellen rekonstituiert die TCDD-Sensitivität

Ist die fehlende AhR-Expression der einzige Grund für die ausbleibende Proliferationshemmung durch TCDD in den rezeptordefizienten Varianten? Um die kausale Rolle des AhR bei der TCDD-bedingten Proliferationshemmung zu zeigen, sollte dieser in den rezeptordefizienten Varianten stabil exprimiert werden. Die Northern-Blot-Analyse zeigte, daß in den BP8-Zellen im Gegensatz zu den D1-Zellen keine AhR mRNA mehr nachweisbar ist und diese somit wirklich rezeptordefizient sind (siehe Weiß, Diplomarbeit 1995). Deshalb wurde in den BP8-Zellen (im weiteren BP8<sup>AhR-</sup>-Zellen genannt) zunächst versucht, ein für den AhR kodierendes Expressionsplasmid durch Koexpression eines selektierbaren Neomycinresistenzgens stabil zu integrieren. Dieser Ansatz scheiterte wahrscheinlich aufgrund der zu hohen Expressionsrate des AhR, der durch Proliferationshemmung die Expansion rezeptorpositiver Zellen verhinderte (Weiß, Diplomarbeit 1995).

Durch Infektion und anschließende Puromycinselektion konnte jedoch ein rekombinantes, für den AhR kodierendes, retrovirales Expressionsplasmid in die BP8<sup>AhR-</sup>-Zellen stabil integriert werden (durchgeführt von Martin Göttlicher). Nach TCDD-Behandlung konnte in einem der resistenten Klone (der im weiteren BP8<sup>AhR+</sup> genannt wird) ein transient transfiziertes XRE-Reporter gen konstruiert und aktiviert werden (Weiß *et al.*, 1996). In den BP8<sup>AhR+</sup>-Zellen konnte nur eine geringe AhR-Aktivität nachgewiesen werden, die sich beispielsweise in einer mindestens 10-fach verringerten TCDD-Bindung (weniger als 10 fmol/mg zytosolischem

Protein) in den zytosolischen Extrakten dieser Zellen gegenüber den 5L Wildtypzellen (Weiß *et al.*, 1996) zeigte. Die geringe TCDD-Bindung korreliert auch mit einer gegenüber den 5L-Wildtypzellen stark reduzierten AhR-Proteinmenge in den BP8<sup>AhR+</sup>-Zellen (Abb.6B, vgl. Spur 1 mit Spur 3).



**Abb.6 : Die Proliferationshemmung durch TCDD ist AhR-abhängig.**

(A) Logarithmisch wachsende Zellen wurden für 18 h ohne (- TCDD) bzw. in Gegenwart von 1 nM TCDD (+ TCDD) kultiviert. Die zelluläre DNA wurde mit dem Farbstoff H33258 (Hoechst) gefärbt und dessen Fluoreszenz als Maß für den DNA-Gehalt pro Zelle im Durchflußzytometer bestimmt. Die Anzahl von Zellen wurden über ihren jeweiligen DNA-Gehalt aufgetragen und der sich in der G0/G1-Phase des Zellzyklus befindliche Anteil bestimmt.

(B) Die AhR-Menge wurde aus dem Gesamtzellextrakt der verschiedenen Zelllinien mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Zur Sicherstellung vergleichbar geladener Proteinmengen wurde ein Teil des Gels mit Coomassie-Blau gefärbt (nicht gezeigt).

n.s.: nicht spezifisch mit dem Antikörper reagierendes Protein



Zur Beantwortung der Frage, ob die geringen AhR-Mengen in den BP8<sup>AhR+</sup>-Zellen wieder zu einer Proliferationshemmung nach TCDD-Behandlung führen, wurde zunächst ein Zellzyklusprofil erstellt - ein Verfahren, das kurz erläutert werden soll. In den verschiedenen Phasen des Zellzyklus enthält eine Zelle unterschiedliche DNA-Mengen. Während der S-Phase wird der Chromosomensatz (2N, wobei N die Anzahl der mütterlichen bzw. väterlichen Chromosomen angibt) und damit die DNA-Menge pro Zelle verdoppelt, um nach Durchlaufen der G2-Phase (4N) nach der Mitose wieder halbiert zu werden (2N). Der DNA-Gehalt gibt also die Position einer Zelle im Zellzyklus an. Zur Bestimmung des DNA-Gehalts einer Zelle wird deren Zellmembran permeabilisiert und anschließend die DNA durch Fluoreszenzfarbstoffe gefärbt. Im Durchflußzytometer kann die Emission des aufgenommenen Farbstoffes, die mit der DNA-Menge korreliert, für jede einzelne Zelle gemessen werden. Das Auftragen der Zahl von Zellen mit dem gleichen DNA-Gehalt ergibt dann das Zellzyklusprofil.

Logarithmisch wachsende 5L-, BP8<sup>AhR-</sup>- oder BP8<sup>AhR+</sup>-Zellen wurden für 24 h mit TCDD behandelt und danach das Zellzyklusprofil erstellt. TCDD führt zu einer Akkumulation der 5L-Zellen in der G1-Phase (90% im Vergleich zu 69% in unbehandelten Kulturen; Abb.6A, links). Die rezeptorlosen BP8<sup>AhR-</sup>-Zellen hingegen proliferieren in der Gegenwart von TCDD unverändert (Abb.6A, Mitte). Die in ihrer AhR-Expression rekonstituierten BP8<sup>AhR+</sup>-Zellen akkumulieren nach TCDD-Behandlung wieder in vergleichbarem Ausmaß in der G1-Phase (93%) wie die 5L-Wildtypzellen (90%) (Abb.6A, links mit Abb.6A, rechts). Andere puromycinresistente Klone, die keinen detektierbaren AhR aufwiesen, veränderten ihr Zellzyklusprofil nach TCDD-Gabe nicht (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, daß die rekonstituierte TCDD-Sensitivität in den BP8<sup>AhR+</sup>-Zellen durch den Rezeptor (und nicht aufgrund unspezifischer Effekte der retroviralen Infektion) vermittelt wird. Außer der Proliferationshemmung konnte auch die Induktion eines endogenen Zielgens (*Cytochrom P450 IA1*) in den BP8<sup>AhR+</sup>-Zellen rekonstituiert werden (Kumar Kolluri, pers. Mitteilung). Die stabile Expression des AhR in den BP8<sup>AhR-</sup>-Zellen reicht aus, um die TCDD-Sensitivität zu rekonstituieren. Damit ist das Fehlen des AhR in den BP8<sup>AhR-</sup>-Zellen der einzige für TCDD-Effekte relevante Defekt verglichen mit den 5L-Zellen.

## **4.2 TCDD Wirkungen auf die Regulation der G1-S-Progression in 5L-Zellen**

Die Analyse der Wirkung des AhR auf die Proliferation wurde mit biochemischen Untersuchungen der grundlegenden regulatorischen Ereignisse in der G1-S-Progression begonnen.

### **4.2.1 TCDD-Behandlung hemmt in 5L-Zellen die Phosphorylierung des Retinoblastom(Rb)-Proteins**

TCDD wirkt wahrscheinlich in der mittleren bis späten G1-Phase, da schon 4 h nach Behandlung die Anzahl der sich in der S-Phase befindlichen Zellen reduziert ist (Wiebel *et al.*, 1991). Viele antimitogene Signale wirken vor dem Restriktionspunkt, der die weitere Progression in die S-Phase kontrolliert (siehe Einleitung). Zur Überwindung dieses Kontrollpunktes muß das Rb-Protein phosphoryliert werden.

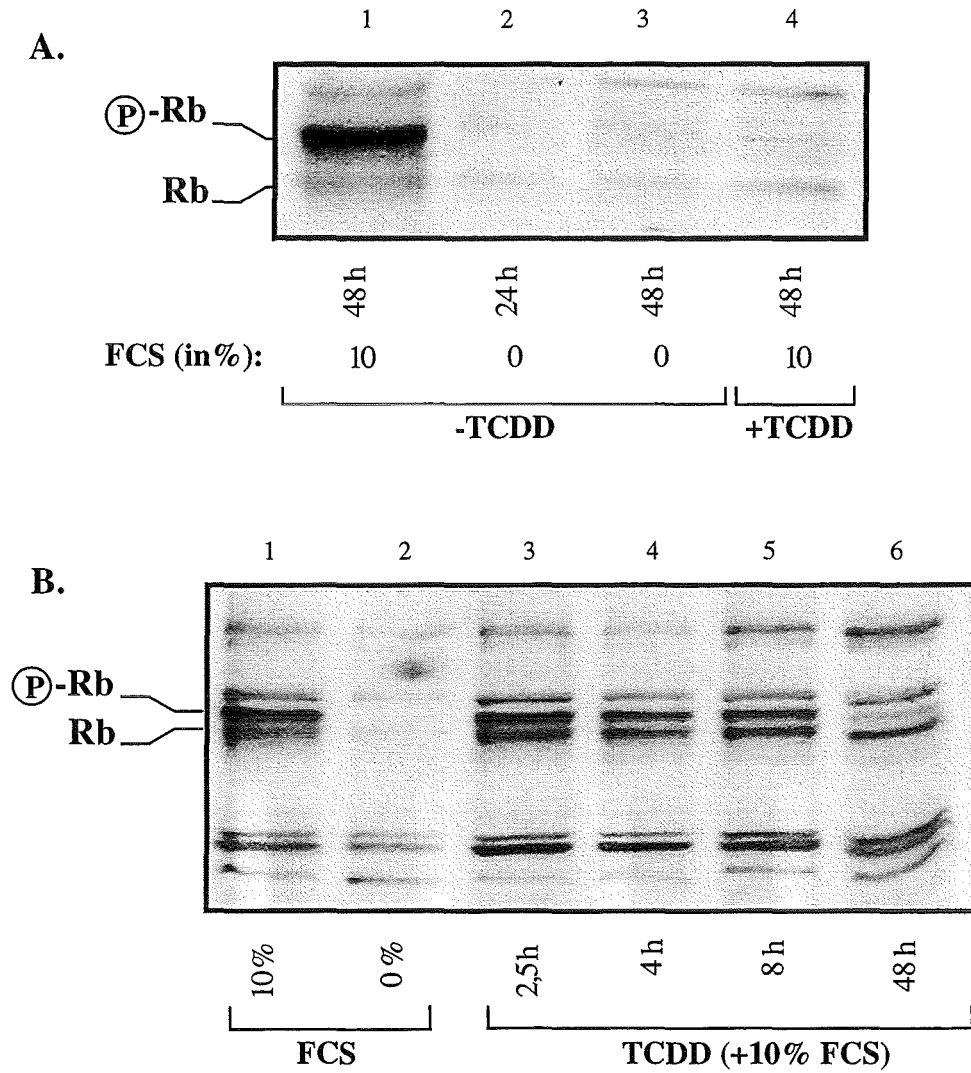
Welchen Einfluß TCDD-Behandlung auf die Rb-Phosphorylierung hat, wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Da TCDD in DMSO gelöst wurde, wurde zur Kontrolle von Lösungsmittelleffekten immer TCDD-behandelte Zellen mit DMSO-behandelten Zellen verglichen. Hyperphosphoryliertes Rb (P-Rb) unterscheidet sich von hypophosphoryliertem Rb (Rb) durch ein verändertes Laufverhalten in der Gelelektrophorese (SDS-PAGE), (entsprechend 115 kD für P-Rb im Vergleich zu 105 kD für Rb).

In logarithmisch wachsenden 5L-Zellen liegt Rb hauptsächlich in der hyperphosphorylierten Form vor (siehe Abb.7A, Spur 1). 48 h TCDD-Behandlung reduziert die Menge an phosphoryliertem Rb (vgl. Abb.7A, Spur 1 mit Spur 4) drastisch und ist mit der nach Wachstumsfaktorentzug (-FCS) beschriebenen Hemmung vergleichbar (siehe Spur 2 und 3). Die Rb-Proteingesamtmenge (P-Rb+Rb) scheint sowohl nach Serumentzug als auch nach TCDD-Behandlung reduziert und erklärt sich am wahrscheinlichsten durch eine geringere Affinität des verwendeten Rb-Antikörpers für die hypophosphorylierte Rb-Form (vgl. z.B. Spur 2 und 1).

Wie schnell hemmt TCDD die Rb-Phosphorylierung? Zur Beantwortung dieser Frage wurden logarithmisch wachsende 5L-Zellen für unterschiedliche Zeiten mit TCDD behandelt und die Rb-Phosphorylierung analysiert.

Zweieinhalbstündige TCDD-Behandlung führt zu einer schwachen Verringerung des Verhältnis von P-Rb zu Rb (Abb.7B, vgl. Spur 1 und 3). Die Hemmung der Rb-Phosphorylierung wird mit zunehmender Behandlungsdauer deutlicher (Abb.7B, vgl. Spur 1

mit den Spuren 4, 5 und 6). TCDD wirkt innerhalb von 2,5 h, also kurz vor der Rb-Phosphorylierung, zu einem Zeitpunkt an dem die notwendigen Zyklone und aktiven Zyklin/CDK-Komplexe in der Regel schon synthetisiert sind. Somit hemmt TCDD die Rb-Phosphorylierung voraussichtlich durch die Hemmung der schon gebildeten Zyklin/CDK-Komplexe.



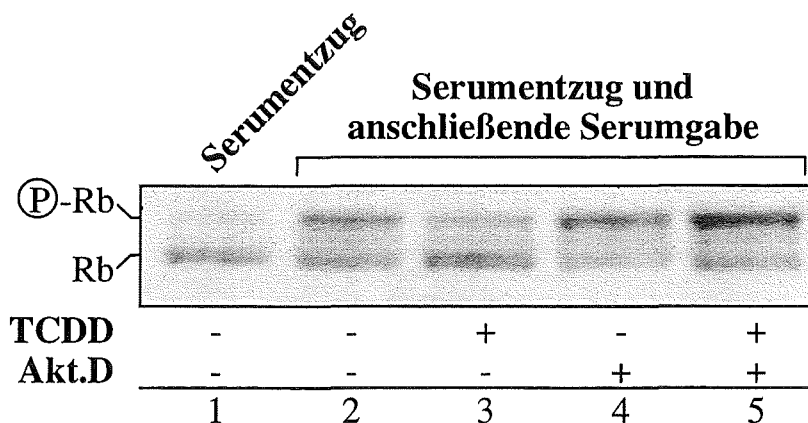
**Abb.7: TCDD hemmt die Rb-Phosphorylierung in 5L-Zellen.**

Logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden vor der Analyse für die angegebenen Zeiten mit 1 nM TCDD-haltigem Medium oder ohne TCDD in 10% bzw. 0% fötales Kälberserum enthaltendem Medium inkubiert. Im Gesamtzellextrakt wurde anschließend die Menge an hyperphosphoryliertem (P-Rb) bzw. hypophosphoryliertem Rb mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Zur Sicherstellung gleichmäßig geladener Proteinmengen wurde ein Teil des Gels mit Coomassie-Blau gefärbt (nicht gezeigt).

(A) Wirkung von Serumentzug und TCDD auf die Rb-Phosphorylierung. (B) Zeitkinetik der TCDD Wirkung auf die Rb-Phosphorylierung. Zum Vergleich sind auch Extrakte von serumgehungenerten Zellen (24 h, 0% FCS) aufgetragen.

## 4.2.2 Die Hemmung der Rb-Phosphorylierung durch TCDD ist transkriptionsabhängig

Benötigt eine Zelllinie Wachstumsfaktoren zur Proliferation, kann man diese durch Inkubation in serumfreiem Medium in der frühen G1-Phase arretieren. Nach erneuter Gabe von serumhaltigem Medium starten alle Zellen vom gleichen Punkt im Zellzyklus und proliferieren synchron. Nachdem die synchronisierten Zellen in der frühen bis mittleren G1-Phase die zur weiteren Progression notwendigen Proteine, wie z.B. die Zykline, synthetisiert haben, ist zur Ausbildung aktiver Zyklin/CDK-Komplexe in der mittleren bis späten G1-Phase keine weitere Transkription erforderlich. So können Zellen in dieser Phase auch in Gegenwart von Hemmstoffen der Transkription Rb phosphorylieren (Steiner *et al.*, 1995). Dies ermöglicht die experimentelle Beantwortung der Frage, ob zur Hemmung der Rb-Phosphorylierung durch den AhR *de novo* Genexpression benötigt wird bzw. ob TCDD auch in Gegenwart von Hemmstoffen der Transkription die G1-S-Progression hemmt.



**Abb.8: Die Hemmung der Rb-Phosphorylierung durch TCDD erfordert Transkription.**

5L-Zellen wurden durch 24 h Inkubation in serumfreiem Medium im Zellzyklus arretiert und durch Serungabe wieder zur Proliferation stimuliert. 8 h nach Serumstimulation wurde die Menge an hyperphosphoryliertem (P-Rb) bzw. hypophosphoryliertem Rb mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Zur Sicherstellung gleichmäßig geladener Proteinmengen wurde ein Teil des Gels mit Coomassie-Blau gefärbt (nicht gezeigt). 2 h vor der Extraktanfertigung wurde einem Teil der Kulturen entweder 1 nM TCDD, 5 µg/ml Aktinomyzin D oder beides zugesetzt.

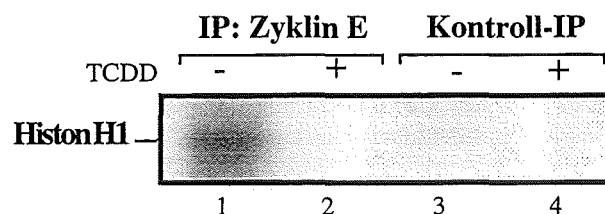
Nach Serumentzug akkumulieren 5L-Zellen mit hypophosphoryliertem Rb (siehe Abb 8, Spur 1). Erneute Serungabe führt nach 8 h zur Zunahme an hyperphosphoryliertem Rb (Abb.8, Spur 2). Werden die Zellen 2 h zuvor mit TCDD behandelt, führt dies zu einer deutlichen Hemmung der Rb-Phosphorylierung (Abb.8, vgl. Spur 3 und 4). Daß die Hemmung der Rb-Phosphorylierung nicht komplett erscheint (Abb.8, vgl. Spur 1 und 3) liegt wahrscheinlich daran, daß in einigen Zellen schon vor der TCDD-Gabe Rb phosphoryliert wurde. Inkubation mit dem Transkriptionshemmer Aktinomyzin D alleine verhindert in dieser Phase des Zellzyklus nicht die G1-S-Progression (Abb.8, Spur 4). Jedoch verhindert

Aktinomyzin D die TCDD-Wirkung auf die Rb-Phosphorylierung (Abb.8, vgl. Spur 3 und 5). Dies zeigt, daß die Hemmung der Rb-Phosphorylierung nach TCDD-Behandlung Transkription erfordert.

### 4.2.3 TCDD hemmt die Zyklin E assoziierte Kinaseaktivität von CDK2

Eine Voraussetzung für die G1-S-Progression ist die Phosphorylierung von Rb durch den Zyklin E/CDK2-Komplex (Ohtsubo *et al.*, 1995; Blain *et al.*, 1997) Ob TCDD die Aktivität dieses Kinasekomplexes hemmt, wurde mit Hilfe einer Immunkomplexkinasereaktion getestet. Nach Immunpräzipitation des Zyklin E/CDK2-Komplexes mittels für Zyklin E spezifischen Antikörpern und anschließender Inkubation mit dem Substrat Histon H1 in Gegenwart von radioaktivem ATP wird das phosphorylierte und somit radioaktiv markierte Substrat nach der Gelelektrophorese im Autoradiogramm sichtbar.

In unbehandelten, logarithmisch wachsenden 5L-Zellen kann nur mit dem gegen Zyklin E gerichteten Antikörper eine Histon H1-spezifische Kinaseaktivität präzipitiert werden, während die Verwendung eines Antikörpers gegen ein am Zellzyklus unbeteiligtes Protein keine spezifische Kinaseaktivität präzipitiert (Abb.9, vgl. Spur1 und Spur 3). TCDD-Behandlung führt zu einer nahezu vollständigen Hemmung der Zyklin E assoziierten CDK2-Aktivität (Abb.9, vgl. Spur 1 und2).



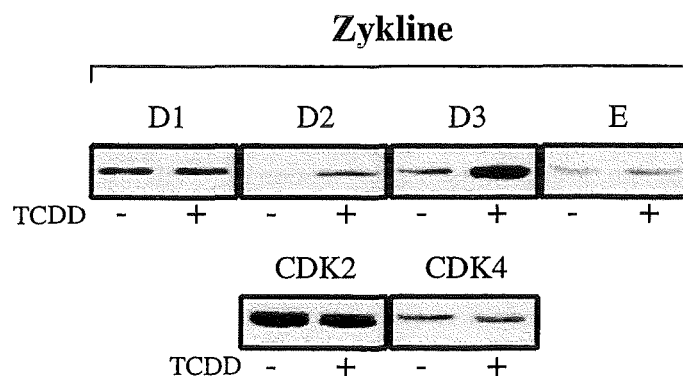
**Abb.9: TCDD hemmt die Zyklin E / CDK2-assozierte Kinaseaktivität.**

Logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden 24 h in 1 nM TCDD- oder 0,1% DMSO-haltigem Medium inkubiert. Anschließend wurde die Zyklin E-abhängige Histon H1-Kinaseaktivität durch Präzipitation mit einem für Zyklin E spezifischen (Spur 1 und 2) oder unspezifischen Antikörper (Spur 3 und 4) in einer Immunkomplex-Kinase Analyse bestimmt.

Faßt man die bereits beschriebenen Ergebnisse zusammen ist die negative Wirkung von TCDD auf die Rb-Phosphorylierung ein transkriptionsabhängiger Prozeß (siehe 4.2.2, Abb.8), der zur Hemmung der Zyklin E assoziierten CDK2-Aktivität führt (siehe 4.2.3, Abb.9). Diese Befunde ließen sich entweder durch die Reduktion der Zyklin- bzw. CDK-Menge oder durch die Induktion eines CDK-Inhibitors erklären.

#### 4.2.4 TCDD verringert weder die Menge von Zyklin D und Zyklin E noch die der Kinasen CDK2 und CDK4

In logarithmisch wachsenden 5L-Zellen führt TCDD weder zur Reduktion der Menge der Zykline D1, D2 oder D3 noch des Zyklin E (siehe Abb.10, obere Reihe). Dies trifft ebenso für die Kinasen CDK2 und CDK4 zu (siehe Abb.10, untere Reihe). Die Mengen an Zyklin D2 bzw. D3 sind nach TCDD-Gabe sogar erhöht. Eine Erklärung hierfür wäre, daß TCDD die Zellen in einer mit erhöhten Mengen an Zyklin D2 bzw. D3 assoziierten Zellzyklusphase akkumulieren läßt. Da der Anstieg an Zyklin D2 bzw. D3 als Ursache für die Proliferationshemmung eher unwahrscheinlich war, wurde diese Beobachtung im Laufe der Arbeit nicht weiter verfolgt.



**Abb.10: TCDD verringert die Menge der wesentlichen G1-Zykline bzw. -CDKs in 5L-Zellen nicht.**

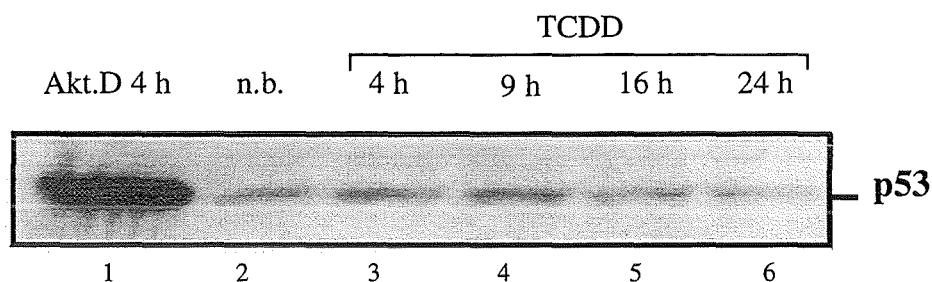
Logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden für 24 h in Gegenwart von 1 nM TCDD oder 0,1% DMSO kultiviert und anschließend wurde ein Gesamtzellextrakt angefertigt. Die Menge der Zykline D1, D2, D3 und E bzw. der zyklinabhängigen Kinasen CDK2 und CDK4 wurde in der Western-Blot-Analyse bestimmt. Zur Sicherstellung gleichmäßig geladener Proteinmengen wurde ein Teil des Gels mit Coomassie-Blau gefärbt (nicht gezeigt).

#### 4.2.5 Die Menge an p53-Protein wird durch TCDD nicht erhöht

Ein zentraler Mechanismus wie die Rb-Phosphorylierung beispielsweise nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien, UVC - oder ionisierender Strahlung durch die Induktion von Kinaseinhibitoren gehemmt wird, stellt die Stabilisierung des Tumorsuppressorgenprodukts p53 dar. Die erhöhten p53 Proteinmengen führen zu einer verstärkten Transkription des CDK-Inhibitors p21<sup>Cip1</sup> und hemmen so die Aktivität der Zyklin/CDK-Komplexe (el-Deiry, 1998). Für Benz(a)pyren (B(a)P), einem AhR-Liganden, der im Gegensatz zu TCDD nach metabolischer Aktivierung auch DNA-Schäden verursacht, wurde eine Erhöhung der p53 Proteinmenge beschrieben (Vaziri und Faller, 1997). Deshalb wurde

mittels Western-Blot-Analyse der Einfluß von TCDD auf die p53-Proteinmenge in 5L-Zellen überprüft.

Behandlung mit dem Transkriptionshemmer Aktinomyzin D bewirkt, wahrscheinlich durch Simulierung eines DNA-Schadens (Blattner *et al.*, 1994; Herrlich *et al.*, 1997), eine deutliche Induktion des p53-Proteins (Abb.11, vgl. Spur 1 und 2). Somit besitzen 5L-Zellen wahrscheinlich Wildtyp p53, da sich mutiertes p53 zumeist aufgrund seiner erhöhten Stabilität nicht noch zusätzlich stabilisieren ließe (Blagosklonny, 1997). TCDD-Behandlung führt zu keiner Zunahme von p53-Protein (Abb.10, vgl. Spur 2 und 3-6). Somit verursacht TCDD die Proliferationshemmung nicht durch die Stabilisierung des p53-Proteins.



**Abb.11: In 5L-Zellen wird die p53-Proteinmenge durch TCDD nicht erhöht.**

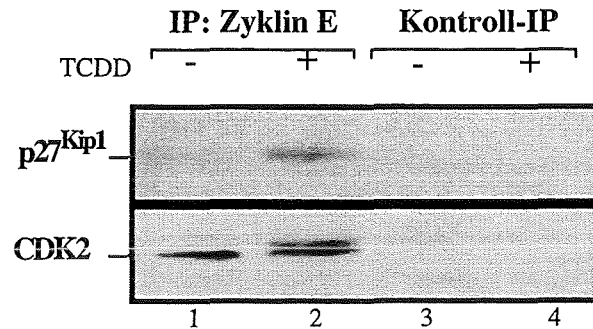
Logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten in Gegenwart von 1 nM TCDD oder 5 µg/ml Aktinomyzin D inkubiert. Im Gesamtzellextrakt wurde anschließend die Menge an p53-Protein mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Zur Sicherstellung gleichmäßig geladener Proteinmengen wurde ein Teil des Gels mit Coomassie-Blau gefärbt (nicht gezeigt). n.b.: nicht behandelt

#### **4.2.6 TCDD führt zur verstärkten Interaktion von p27<sup>Kip1</sup> mit Zyklin E/CDK2**

Nach einer systematischen Analyse aller CDK-Inhibitoren im Labor konnte die Induktion des p27<sup>Kip1</sup>-Proteins gezeigt werden. p27<sup>Kip1</sup> hemmt die Aktivität von Zyklin D/CDK4- bzw. 6- und Zyklin E/CDK2-Komplexen durch direkte Proteininteraktion (Hengst und Reed, 1998). Wenn die Induktion von p27<sup>Kip1</sup> tatsächlich für die Hemmung der Rb-Phosphorylierung durch TCDD verantwortlich ist, dann sollte eine verstärkte Bindung von p27<sup>Kip1</sup> an Zyklin E/CDK2 nachweisbar sein.

Mit gegen Zyklin E gerichteten Antikörpern ist es möglich, sowohl die interagierende Kinase CDK2 als auch Zellzyklusinhibitoren aus der Cip/Kip-Familie gemeinsam zu präzipitieren (Koimmunpräzipitation). Das so erhaltene Präzipitat läßt sich nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Western-Blot analysieren.

In unbehandelten 5L-Zellen wird zusammen mit CDK2 schon basal p27<sup>Kip1</sup> koimmunpräzipitiert (Abb.12, Spur 1, oben), dessen Bedeutung für die Funktion der Kinasekomplexe bisher ungeklärt ist (LaBaer *et al.*; 1997, Hengst *et al.*, 1998). TCDD erhöht die Menge an interagierendem p27<sup>Kip1</sup> (Abb.12, vgl. Spur 1 und 2, oben). Die TCDD-Behandlung führt zu einer zusätzlichen, langsamer migrierenden CDK2 Bande (Abb.12, vgl. Spur 1 und 2, unten). Dabei handelt es sich vermutlich um eine Form von CDK2, deren Phosphorylierung durch die Interaktion mit p27<sup>Kip1</sup> verhindert wurde (Kato *et al.*, 1994).



**Abb.12: TCDD erhöht die mit Zyklin E assoziierte Menge von p27<sup>Kip1</sup>.**

Logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden 24 h in Gegenwart von 1 nM TCDD- oder 0,1% DMSO-haltigem Medium inkubiert. Die an Zyklin E gebundene Menge an p27<sup>Kip1</sup> bzw. CDK2 wurde anschließend durch Präzipitation mit einem für Zyklin E spezifischen (Spur 1 und 2) oder unspezifischen Antikörper (Spur 3 und 4) mittels Western-Blot-Analyse bestimmt.

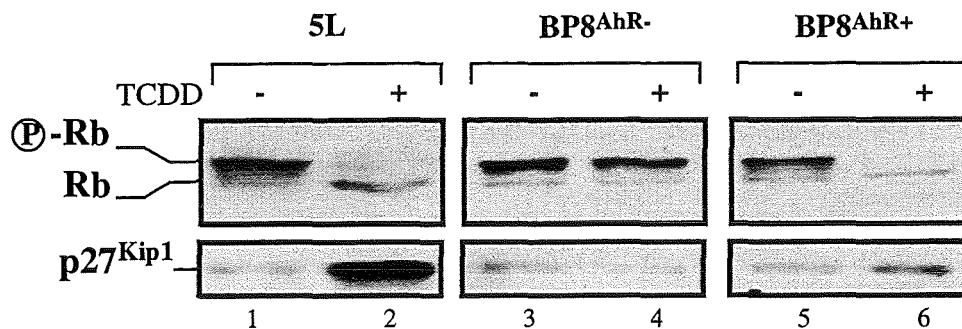
Die verstärkte Interaktion von p27<sup>Kip1</sup> mit dem Zyklin E/CDK2-Komplex kann plausibel die Hemmung der G1/S-Progression durch TCDD erklären. Mittels genetischer Methoden konnte die Expression von p27<sup>Kip1</sup> durch die Transfektion eines für den Gegenstrang kodierenden „antisense“-Plasmids verhindert werden und nach anschließender TCDD-Gabe keine Hemmung der Proliferation in 5L-Zellen mehr beobachtet werden (Kolluri, Dissertation 1998). Somit ist p27<sup>Kip1</sup> essentiell für die Proliferationshemmung durch TCDD in 5L-Zellen.



#### 4.2.7 Die Regulation von p27<sup>Kip1</sup> durch TCDD ist AhR-abhängig

Wenn die p27<sup>Kip1</sup>-Induktion die Wachstumshemmung durch TCDD vermittelt, muß gefordert werden, daß die Induktion von p27<sup>Kip1</sup> in AhR-defizienten Zellen ausbleibt.

TCDD führt in 5L-Zellen zur Akkumulation von hypophosphoryliertem Rb (Abb.13, vgl. Spur 1 und 2, oben) und gleichzeitiger p27<sup>Kip1</sup>-Induktion (Abb.13, vgl. Spur 1 und 2, unten). In den AhR-defizienten BP8<sup>AhR-</sup>-Zellen kann keine Hemmung der Rb-Phosphorylierung (Abb.13, vgl. Spur 3 und 4, oben) und keine Induktion von p27<sup>Kip1</sup> (Abb.13, vgl. Spur 3 und 4, unten) beobachtet werden. Nach Expression des AhR in den BP8<sup>AhR-</sup>-Zellen wird wie die Proliferationshemmung (siehe 4.1, Abb.6A) auch die Hemmung der Rb-Phosphorylierung (Abb.13, vgl. Spur 5 und 6, oben) und die p27<sup>Kip1</sup>-Induktion (Abb.13, vgl. Spur 5 und 6, unten) rekonstituiert. Die verringerte Induzierbarkeit von p27<sup>Kip1</sup> in den BP8<sup>AhR+</sup>-Zellen im Vergleich zu den 5L-Wildtypzellen ist, wie auch die verringerte *Cyp 1A1*-Induktion bzw. Ligandenbindung (siehe 4.1 und Weiß *et al.*, 1996), am wahrscheinlichsten durch die geringere AhR-Menge erklärbar.

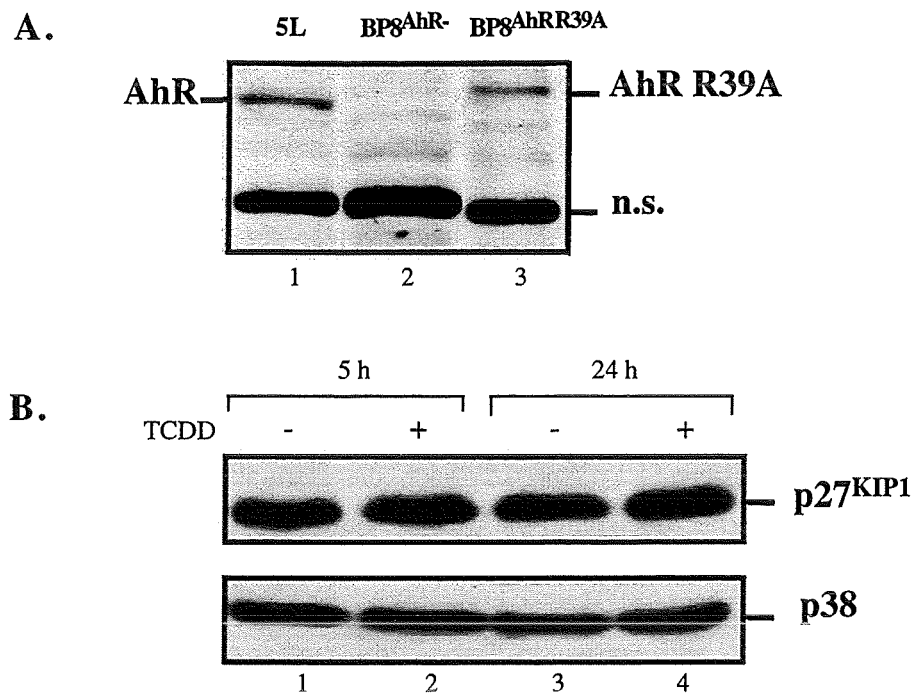


**Abb.13: Die Hemmung der Rb-Phosphorylierung und die p27<sup>Kip1</sup>-Induktion durch TCDD sind AhR-abhängig.**

Logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden für 24 h in Gegenwart von 1nM TCDD oder 0,1% DMSO kultiviert. Im Gesamtzell-extrakt wurde anschließend die Menge an hyperphosphoryliertem (P-Rb) bzw. hypophosphoryliertem Rb und p27<sup>Kip1</sup> mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Zur Sicherstellung gleichmäßig geladener Proteinmengen wurde ein Teil des Gels mit Coomassie-Blau gefärbt (nicht gezeigt).

#### 4.2.8 Der AhR benötigt eine intakte DNA-Bindungsdomäne zur Induktion von p27<sup>Kip1</sup>

Zur Beantwortung der Frage, ob der AhR zur Induktion von p27<sup>Kip1</sup> an eine spezifische DNA-Erkennungsequenz binden muß, wurde ein in der DNA-Bindungsdomäne (kurz DBD) punktmutierter AhR (AhR R39A) in den BP8<sup>AhR-</sup>-Zellen stabil überexprimiert. Die eingeführte Punktmutation führt zum Austausch der Aminosäure Arginin an Position 39 durch Alanin und verhindert die Bindung des AhR an das bisher bekannte DNA-Bindungsmotiv (XRE) (Dong *et al.*; 1996).



**Abb.14: Der AhR benötigt eine intakte DNA-Bindungsdomäne zur p27<sup>KIP1</sup>-Induktion.**

(A) Ein in der DNA-Bindungsdomäne punktmutierter AhR (AhR R39A) wurde in BP8<sup>AhR</sup>-Zellen durch stabile Transfektion exprimiert. Das ektopisch exprimierte AhR-Protein wurde mittels Western-Blot-Analyse im Vergleich mit 5L- und BP8<sup>AhR</sup>-Zellen aus Gesamtzellextrakten nachgewiesen. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit 14 stabil transfizierten Zellklonen erhalten. Da die für den Maus-AhR kodierende cDNA zur Anfertigung des punktmutierten AhR R39A verwendet wurde, besitzt der AhR R39A im Vergleich zum WT-AhR aus der Ratte ein verändertes Laufverhalten in der Gelelektrophorese.

(B) Logarithmisch wachsende BP8<sup>AhR R39A</sup>-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten in Gegenwart von 1 nM TCDD oder 0,1% DMSO inkubiert. Im Gesamtzellextrakt wurde die Menge an p27<sup>KIP1</sup> mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Zur Sicherstellung gleichmäßig geladener Proteinmengen wurde ein Teil des Gels mit Coomassie-Blau gefärbt (nicht gezeigt) bzw. die Menge eines nicht durch TCDD beeinflussten Proteins (p38-MAPK) mittels Western-Blot-Analyse bestimmt (unteres Bild).

n.s.: nicht spezifisch mit dem Antikörper reagierendes Protein

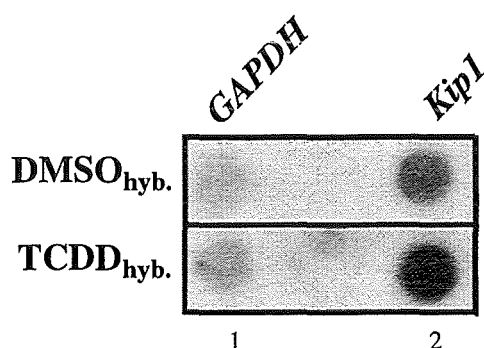
Trotz mit dem AhR-Wildtyp-Protein vergleichbaren Expressionsstärken (Abb.14A., vgl. Spur 1 und 3) vermittelt der in der DBD mutierte AhR keine p27<sup>KIP1</sup>-Induktion nach TCDD (Abb.14B., vgl. Spur 1 und 2 bzw. Spur 3 und 4). Voraussetzung für die Induktion von p27<sup>KIP1</sup> ist also eine intakte DBD des AhR. Deshalb ist es wahrscheinlich, daß der AhR selbst an DNA bindet und entweder direkt die *Kip1*-Genexpression verstärkt oder indirekt durch die Induktion eines zwischengeschalteten Proteins zur p27<sup>KIP1</sup>-Erhöhung führt.

Nach TCDD-Behandlung konnte in 5L-Zellen eine Erhöhung der *Kip1*-mRNA-Menge gezeigt werden (Kolluri, Dissertation 1998). Da TCDD auch in Gegenwart des Translationshemmers Cycloheximid die *Kip1*-mRNA induziert und keine Stabilisierung der *Kip1*-mRNA bewirkt (Kolluri, Dissertation 1998), kann der AhR wahrscheinlich direkt die

*Kip1*-Genexpression verstärken. Dies sollte durch direkte Messung der nach TCDD Behandlung neu synthetisierten *Kip1*-Transkripte gezeigt werden.

#### 4.2.9 TCDD erhöht die Transkription des *Kip1*-Gens

In einer als „nuclear run off“ bezeichneten Analyse kann die Neusynthese von mRNAs bestimmt werden. Zur Entfernung zytoplasmatischer mRNAs wurden zuerst aus TCDD- bzw. DMSO-behandelten Zellen die Kerne isoliert. Diese wurden anschließend für 30 Minuten in Gegenwart von radioaktiv markiertem UTP inkubiert, durch dessen Einbau alle neu synthetisierten RNAs markiert werden. Die so markierten Transkripte wurden danach mit immobilisierten cDNAs der Gene *GAPDH* und *Kip1* hybridisiert.



**Abb.15: TCDD erhöht die Neusynthese der *Kip1*-mRNA.**

Logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden für 4 h in Gegenwart von 1 nM TCDD oder 0,1% DMSO kultiviert. Die isolierten Zellkerne wurden für 30 min in radioaktiv markiertes UTP enthaltendem Reaktionspuffer inkubiert. Die isolierte Gesamt-RNA wurde mit den, auf einer Nitrozellulosemembran immobilisierten cDNAs für *Kip1* bzw. *GAPDH* für 36 h hybridisiert. Die jeweilige Signalstärke wurde mit einem Phospho-Imager (Fuji) quantifiziert. DMSO<sub>hyb.</sub> (bzw. TCDD<sub>hyb.</sub>) bedeutet, daß die obere (bzw. untere) Membran mit der aus den mit DMSO (bzw. TCDD) behandelten Zellen gewonnenen radioaktiv markierten RNA hybridisiert wurde.

Die Induktion der *Kip1*-mRNA durch TCDD beträgt  $2 \pm 0,5$  (Mittelwert  $\pm$  Streuung, zwei Experimente) und ergibt sich aus dem Verhältnis von  $Kip1 (TCDD_{hyb}) / Kip1 (DMSO_{hyb})$  dividiert durch  $GAPDH (TCDD_{hyb}) / GAPDH (DMSO_{hyb})$ . Die Abbildung zeigt eines von zwei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

Wenn TCDD die Transkriptmenge des *Kip1*-Gens erhöht, sollten mehr *Kip1*-Transkripte an die entsprechende immobilisierte cDNA binden. Die Hybridisierung der cDNAs mit der radioaktiv markierten RNA aus Kernen von TCDD- bzw. DMSO-behandelten Zellen erfolgte auf zwei unterschiedlichen Membranen. Zum Ausgleich eventueller unterschiedlicher Hybridisierungseffizienzen diente der Bezug auf die Expression des durch TCDD nicht induzierten *GAPDH*-Gens. TCDD bewirkt eine Verdopplung der Transkriptionsrate des *Kip1*-Gens (Abb.15).

Die Transkription eines Gens wird hauptsächlich durch stromaufwärts gelegene DNA-Sequenzen, dem Promotor, kontrolliert. Aus der Ratte ist der *Kip1*-Promotor bisher nicht

kloniert, jedoch sind bis zu ungefähr 2 kB der Promotorsequenz des *Kip1*-Gens der Maus bekannt (Kwon *et al.*; 1996). Da p27<sup>Kip1</sup> ebenso in Mausthymozyten durch TCDD induziert wird (M.Göttlicher, pers. Mitteilung) und AhR-Zielgene in beiden Spezies sehr ähnlich reguliert sind (Swanson *et al.*, 1995), wurde die Regulation des *Kip1*-Promotors aus der Maus durch TCDD analysiert.

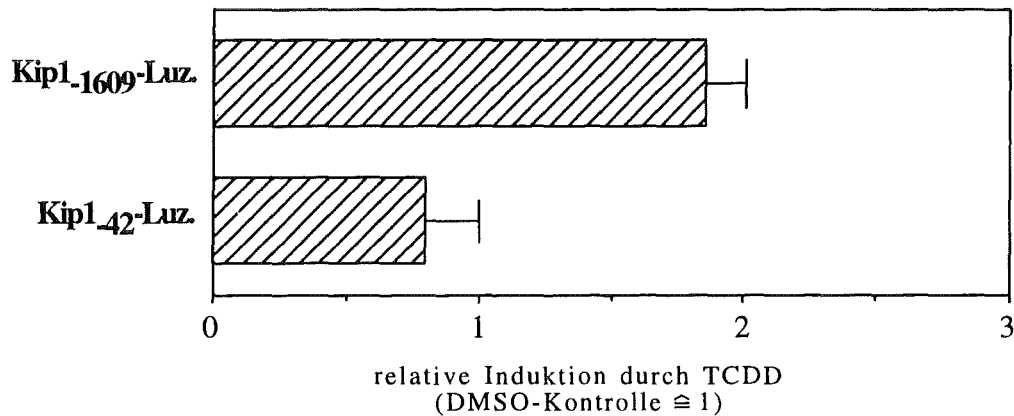
#### 4.2.10 TCDD aktiviert den *Kip1*-Promotor

Ein Luziferasereportergenkonstrukt, das die bis zur Position -1609 stromaufwärts gelegene Sequenz des *Kip1*-Promotors enthält (Kwon *et al.*, 1996), wurde auf seine Induzierbarkeit durch TCDD getestet.

In den mit dem Reportergenkonstrukt zuerst durchgeführten transienten Transfektionen verdoppelte ( $1,9 \pm 0,2$ ) 24 h TCDD-Behandlung die Luziferaseaktivität des Kip1<sub>-1609</sub>-Konstrukts und hatte keinen Effekt auf das Kip1<sub>-42</sub>-Konstrukt (Abb.16). Somit befindet sich mindestens ein TCDD-responsives Element in einer zwischen der Position -1609 und -42 gelegenen Region des *Kip1*-Promotors der Maus.

Die Erhöhung der transfizierten Plasmidmenge des Reportergens verringerte die Induzierbarkeit des Promotors (Daten nicht gezeigt) und könnte als ein „Wegfangen“ eines für die Promotoraktivität kritischen, in limitierender Menge zur Verfügung stehenden Faktors interpretiert werden. Dieser Effekt begrenzte eventuell ebenso die Induktion bei den in Abb.16 gezeigten Experimenten.

Um die Induzierbarkeit des *Kip1*-Promotors zu verbessern, sollte eine möglichst geringe Kopienzahl des transfizierten Plasmids pro Zelle erzielt werden. Eine Möglichkeit dies zu erreichen ist die stabile Integration des Reportergens in das Genom der Zielzelle. Hierzu wurde das Kip1<sub>-1609</sub>-bzw. Kip1<sub>-42</sub>-Konstrukt zusammen mit einem für ein Resistenzgen (neo) kodierendem Plasmid transfiziert und anschließend G-418-resistente Klone selektioniert. Diese wurden danach zur Vermeidung klonaler Variationen vereint („gepoolt“) und der so erhaltene Pool auf seine TCDD Sensitivität getestet.



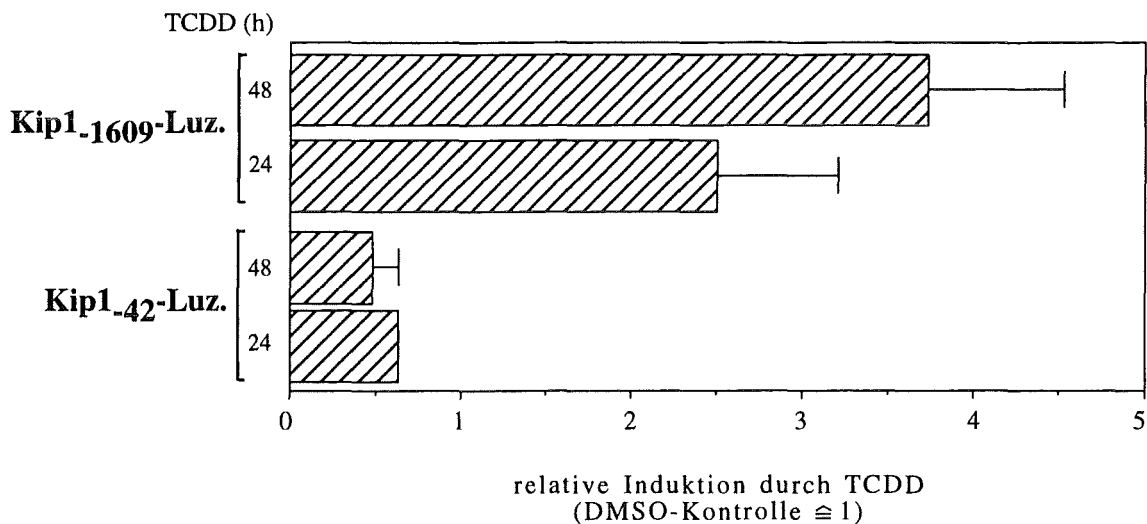
**Abb.16: TCDD aktiviert den Kip1-Promotor nach transients Transfektion in 5L-Zellen.**

1,25 x 10<sup>5</sup> logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden mit 0,01 µg Kip1<sub>1609</sub>-Luziferasereporterplasmid mittels Lipid-vermittelter Transfektion (Lipofektion) transient transfiziert. Um unspezifische TCDD-Effekte auf das zur Klonierung verwendete Luziferasereporterplasmid auszuschließen, wurde in einem parallelen Ansatz das Kip1<sub>42</sub>-Luziferasereporterplasmid transient transfiziert. Da im Vergleich zu Kip1<sub>1609</sub>-Luz. bei einer transfizierten DNA-Menge von 0,01 µg Kip1<sub>42</sub>-Luz. keine Aktivität meßbar ist, wurden 0,8 µg Kip1<sub>42</sub>-Luz. eingesetzt. Die transient transfizierten Zellen wurden vor der Bestimmung der Luziferaseaktivität 24 h in Gegenwart von 1 nM TCDD- oder 0,1% DMSO kultiviert.

Die erhaltenen Werte wurden durch die Kotransfektion von je 0,2 µg eines für die Renilla-Luziferase kodierenden Expressionsplasmids, dessen Expression durch TCDD unbeeinflusst ist, normalisiert. Die Induktion ergibt sich aus dem Verhältnis der nach TCDD- bzw. DMSO-Behandlung erhaltenen normalisierten Werte. In jedem Experiment wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Abbildung zeigt das Ergebnis von drei (Kip1<sub>1609</sub>-Luz.) bzw. zwei (Kip1<sub>42</sub>-Luz.) unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± Standardabweichung).

Kip1<sub>1609</sub>- bzw. Kip1<sub>42</sub>-Luz.: Luziferasereporterplasmidkonstrukte, die den bis zur Position -1609 bzw. -42 reichenden Kip1-Promotorbereich enthalten.

Das stabil integrierte Kip1<sub>42</sub>-Reporterplasmidkonstrukt scheint nach 24 h bzw. 48 h TCDD-Behandlung reprimiert (Abb.17, unten) und erklärt sich wahrscheinlich aus der durch TCDD verursachten Reduktion der Zellzahl. Die Induzierbarkeit des stabil integrierten Kip1<sub>1609</sub>-Reporterplasmidkonstrukts beträgt nach 24 h 2,5±0,7 und nach 48 h 3,7±0,8 (Abb.17, oben) und ist somit deutlich besser als in den transienten Transfektionsexperimenten (siehe Abb.16). Im Folgenden wurden deswegen die weiteren Promotorstudien immer mit stabil transfizierten Zellpools durchgeführt.

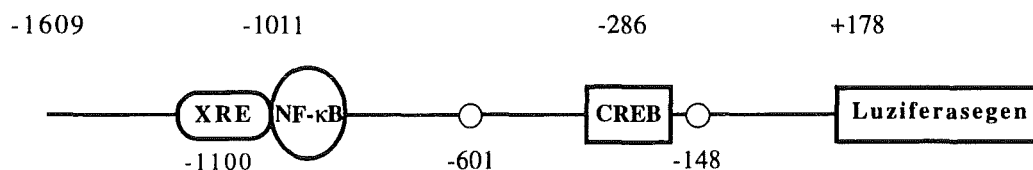


**Abb.17: Aktivierung des Kip1-Promotors nach stabiler Transfektion in 5L-Zellen.**

$5 \times 10^6$  5L-Zellen mit stabil integriertem Kip1<sub>-1609</sub>- bzw. Kip1<sub>-42</sub>-Reportergenkonstrukt wurden auf vier 60 cm<sup>2</sup> Kulturschalen verteilt und für die angegebenen Zeiten in Gegenwart von 1 nM TCDD oder 0,1% DMSO kultiviert. Die Induktion durch TCDD ergibt sich aus dem Verhältnis der Luziferaseaktivität von TCDD-behandelten zu DMSO-behandelten Zellen und ist als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, ermittelt aus je drei (für Kip1<sub>-1609</sub>-Luz.) bzw. zwei (für Kip1<sub>-42</sub>-Luz.) unabhängigen Experimenten, angegeben.

Kip1<sub>-1609</sub>- bzw. Kip1<sub>-42</sub>-Luz.: Luziferasereportergenkonstrukte, die den bis zur Position -1609 bzw. -42 reichenden Kip1-Promotorbereich enthalten und stabil in 5L-Zellen integriert wurden.

Welche Regionen des *Kip1*-Promotors vermitteln die TCDD-Sensitivität? In Abb.18 ist die Promotorsequenz mit ihren potentiellen Bindungsstellen für bekannte Transkriptionsfaktoren schematisch dargestellt. Sie beinhaltet eine potentielle Bindungsstelle (XRE) für den AhR/ARNT-Komplex um die Position -1100 sowie weitere potentielle Bindestellen für die in ihrer Aktivität induzierbaren Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor - $\kappa$ B*) um die Position -1011 und CREB (engl. *cyclic AMP responsive element binding protein*) um die Position -286.



**Abb.18: Schematische Darstellung des Kip1<sub>-1609</sub>-Promotor-Luziferasekonstrukts.**

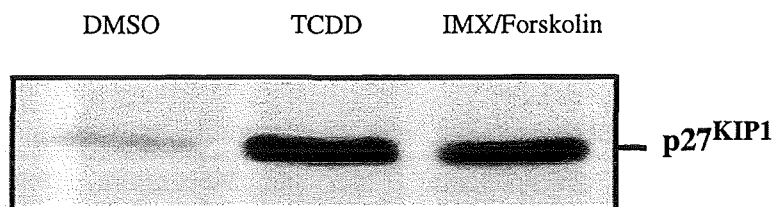
Die zwischen den Positionen -1609 bis +178 gelegene Region des Kip1-Promotors aus der Maus ist vor das Luziferasegen kloniert und enthält potentielle Bindungsstellen für die in ihrer Aktivität induzierbaren Transkriptionsfaktoren CREB (-286), NFK-B (-1011) sowie den AhR/ARNT-Komplex (-1100). An den Positionen -148 und -601 befinden sich, verglichen mit der Konsensussequenz für ein XRE, degenerierte XRE Sequenzen mit einem Basenpaaraustausch in der ARNT-Bindestelle. Die Basenpaarpositionen sind bezogen auf den wahrscheinlichen Transkriptionsstart des Kip1-Promotors.

Die Proliferationshemmung durch TCDD in 5L-Zellen wird wahrscheinlich nicht durch einen XRE-vermittelte Wirkung des AhR bewirkt, da die Überexpression von ARNT zum einen die TCDD Induktion eines XRE-abhängigen Reportergens verstärkt, aber zugleich die Proliferationshemmung verringert (Kolluri, Dissertation 1998). Zum anderen hatte die Überexpression eines mutierten ARNT Proteins, das die TCDD Induktion des XRE-abhängigen Reportergens drastisch hemmte, keine Wirkung auf die Proliferationshemmung (Kolluri, Dissertation 1998).

Zunächst wurde deshalb überprüft, ob die potentiellen Bindestellen für NF- $\kappa$ B bzw. CREB tatsächlich funktionell sind und möglicherweise eine Rolle in der TCDD-Regulation des *Kip1*-Promotors spielen.

#### 4.2.11 Aktivoren der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und CREB führen zu keiner Induktion des *Kip1*-Promotors in 5L-Zellen

Um die Funktion der CREB-Bindestelle im *Kip1*-Promotor zu testen, wurden 5L-Zellen mit zwei Substanzen (IMX/Forskolin) behandelt, welche die intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen und somit CREB aktivieren. Bekannt ist, daß erhöhte cAMP-Spiegel die Akkumulation des p27<sup>Kip1</sup>-Proteins über einen bisher unverstandenen Mechanismus in verschiedenen Zelltypen bewirken (Kato *et al.*, 1994).



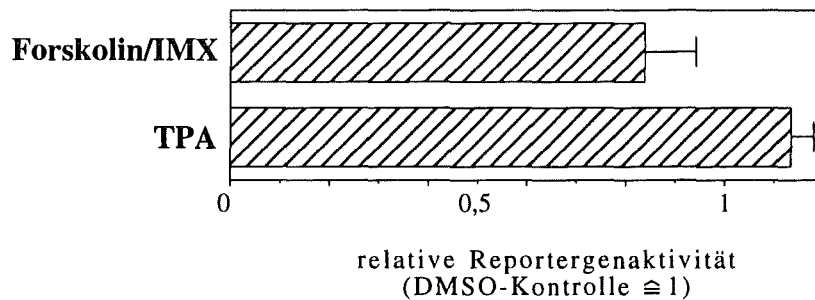
**Abb.19: Induktoren von intrazellulärem c-AMP erhöhen die p27<sup>Kip1</sup>-Menge.**

Logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden für 5 h in Gegenwart von 1 nM TCDD, 10 mM Forskolin/0,5  $\mu$ M IMX oder 0,1% DMSO kultiviert. Die Menge an p27<sup>Kip1</sup> wurde mittels Western-Blot-Analyse aus Gesamtzell-extrakten bestimmt. Zur Sicherstellung gleichmäßig geladener Proteinmengen wurde ein Teil des Gels mit Coomassie-Blau gefärbt (nicht gezeigt).

In 5L-Zellen steigert IMX/Forskolin die p27<sup>Kip1</sup>-Proteinmenge (Abb.19, vgl. Spur 1 und Spur 3), induziert jedoch nicht das *Kip1*<sub>1.1609</sub>-Promotor-Luziferasekonstrukt (Abb.20). Somit handelt es sich bei der potentiellen CREB-Bindestelle wahrscheinlich nicht um eine funktionelle Bindestelle.

Um die Funktion der NF- $\kappa$ B-Bindestelle zu überprüfen, wurde der Tumorpromotor TPA, der sowohl CREB als auch NF- $\kappa$ B aktiviert, verwendet. In 5L-Zellen führt TPA-Behandlung beispielsweise zur AP-1-Aktivierung (siehe 4.3.1) oder zur

CREB-Phosphorylierung (nicht gezeigt). Auf die Aktivität des Kip1<sub>1609</sub>-Promotors hat TPA jedoch keinen Einfluß (Abb.20).



**Abb.20: Aktivatoren der Transkriptionsfaktoren AP-1 und CREB induzieren nicht den Kip1<sub>1609</sub>-Promotor**

Logarithmisch wachsende 5L-Zellen mit stabil integriertem Kip1<sub>1609</sub>-Reportergenkonstrukt wurden für 24 h in Gegenwart von 100 ng/ml TPA bzw. 10 µM Forskolin/0,5 mM IMX oder 0,1% DMSO kultiviert. Die Induktion ergibt sich aus dem Verhältnis der Luziferaseaktivität von TPA- bzw. Forskolin/IMX-behandelten zu DMSO-behandelten Zellen und ist als Mittelwert ± Streuung, ermittelt aus je zwei unabhängigen Experimenten, angegeben.

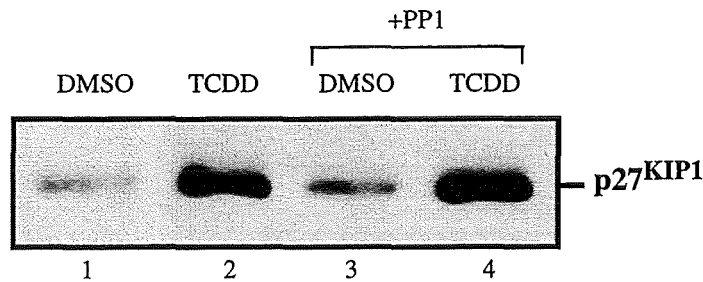
#### 4.2.12 Ein Inhibitor der c-src-Kinase beeinflusst nicht die p27<sup>Kip1</sup>-Induktion durch TCDD

Da die Kip1-Promotorregulation wahrscheinlich über eine XRE-unabhängige AhR-Wirkung vermittelt wird, wurde die Beteiligung einer bisher ungeklärten und wahrscheinlich ebenso XRE-unabhängigen TCDD-Wirkung auf die p27<sup>Kip1</sup>-Induktion untersucht.

Mehrere Arbeitsgruppen vermuten, daß TCDD durch Aktivierung der Kinaseaktivität des Proto-Onkogens c-src wirken kann (Enan und Matsumura, 1996). Aufgrund neu entwickelter spezifischer Inhibitoren der c-src Kinaseaktivität, sollte deren Rolle bei der TCDD-vermittelten p27<sup>Kip1</sup>-Induktion untersucht werden.

In Gegenwart des c-src Inhibitors PP1 wird weder die basale noch die induzierte p27<sup>Kip1</sup>-Menge signifikant beeinflusst (Abb.21). TCDD-Behandlung von 5L-Zellen führt außerdem zu keiner verstärkten Tyrosin-Phosphorylierung der c-src-Kinase und somit wahrscheinlich auch zu keiner Aktivierung der c-src-Kinase (K. Kolluri, pers. Mitteilung). Deshalb spielt c-src wohl eher keine Rolle bei dieser TCDD-Wirkung. Um jedoch die Beteiligung von c-src an der p27<sup>Kip1</sup>-Induktion mit Sicherheit auszuschließen, müßte die Effektivität von PP1 in 5L-Zellen bestätigt werden. Dazu müßte nach geeigneten Aktivatoren der c-src-Kinase in 5L-Zellen gesucht werden und deren Hemmung durch die PP1-Behandlung gezeigt werden.





**Abb.21: Die p27Kip1-Induktion durch TCDD wird durch den c-src-Kinase Inhibitor PP1 nicht gehemmt.**

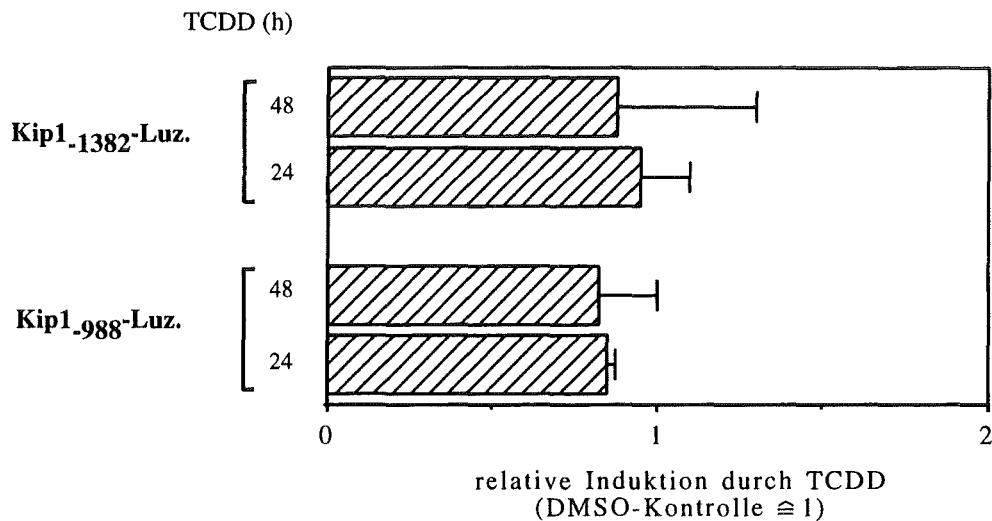
Logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden zuerst für 15 min mit 0,1% DMSO- (Spur 1 und Spur 2) oder mit 10 µg/ml PP1- (Spur 3 und Spur 4) haltigem Medium vorbehandelt und anschließend für weitere 5 h in Gegenwart von 1 nM TCDD oder 0,1% DMSO kultiviert. Die Menge an p27<sup>Kip1</sup> wurde mittels Western-Blot-Analyse aus Gesamtzellextrakten bestimmt. Zur Sicherstellung gleichmäßig geladener Proteinmengen wurde ein Teil des Gels mit Coomassie-Blau gefärbt (nicht gezeigt).

#### **4.2.13 Eine Region zwischen den Positionen -1609 und -1382 des Kip1-Promotors ist essentiell und ausreichend um TCDD-Induzierbarkeit zu vermitteln**

Zur Ermittlung der TCDD-sensitiven Elemente im Kip1-Promotor wurde eine Deletionsanalyse durchgeführt. Dazu wurde die Induzierbarkeit der vom 5'-Ende her verkürzten Kip1-Promotorkonstrukte Kip1<sub>-1382</sub>- und Kip1<sub>-988</sub>-Luz. mit der Induzierbarkeit des Kip1<sub>-1609</sub>-Luz. verglichen.

Weder das Kip1<sub>-1382</sub>- noch das Kip1<sub>-988</sub>- Reportergenkonstrukt sind im Gegensatz zum Kip1<sub>-1609</sub>- Reportergenkonstrukt durch TCDD induzierbar (vgl. Abb.22 mit Abb.17). Somit ist der Bereich zwischen der Position -1609 und -1382 (im weiteren auch als -1609/-1382 Element bezeichnet) essentiell für die Kip1-Promotor-Induktion durch TCDD.

Dieses Ergebnis läßt sich hinsichtlich des Mechanismus der Kip1-Induktion durch TCDD auf zwei Arten interpretieren. Das erste Modell nimmt an, daß der AhR durch Wirkung auf den die Sequenz -1609/-1382 enthaltenden Bereich den Kip1-Promotor induziert. Ein zweites mögliches Modell wäre allerdings auch, daß das -1609/-1382 Element lediglich Voraussetzung für die AhR-Wirkung an einer anderen, im Bereich zwischen den Positionen -1382 und -42 gelegenen, Stelle des Kip1-Promotors ist.

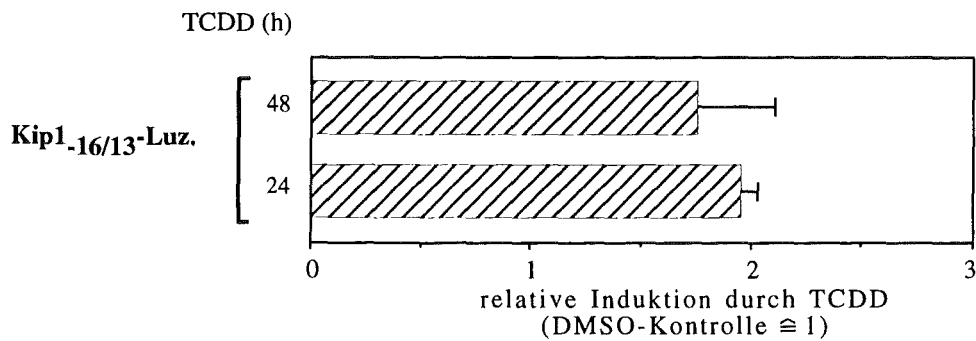


**Abb.22: Die Region zwischen den Positionen -1609 und -1382 des Kip1-Promotors ist essentiell für dessen Induktion durch TCDD.**

$5 \times 10^6$  5L-Zellen mit stabil integriertem Kip1<sub>.1382</sub>- bzw. Kip1<sub>.988</sub>-Reporter-genkonstrukt wurden auf vier  $60 \text{ cm}^2$  Kulturschalen verteilt und für die angegebenen Zeiten in Gegenwart von 1 nM TCDD oder 0,1% DMSO kultiviert. Sowohl das Kip1<sub>.1382</sub>- als auch das Kip1<sub>.988</sub>-Reporter-genkonstrukt wurde in zwei unabhängigen Experimenten transfiziert, wodurch nach Selektion zwei voneinander unabhängige, stabil transfizierte Zellpools entstanden. Die Induktion durch TCDD ergibt sich aus dem Verhältnis der Luciferaseaktivität von TCDD behandelten zu DMSO behandelten Zellen. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  Streuung aus je einem Experiment mit den zwei, stabil mit Kip1<sub>.1382</sub>-Luz. oder Kip1<sub>.988</sub>-Luz. transfizierten Zellpools.

Um zwischen beiden Hypothesen zu unterscheiden, wurde ein den Bereich -1609/-1312 enthaltendes Element vor einen heterologen, durch TCDD nicht induzierbaren Promotor kloniert (minimaler Thymidinkinase(-tk)-Promotor; Weiß, Diplomarbeit 95) und die Induzierbarkeit des -1609/-1312-tk-Konstrukts durch TCDD getestet.

TCDD Behandlung führt nach 24 h bzw. 48 h zur Verdopplung der Luciferaseaktivität in den mit dem -1609/-1312-tk Konstrukt stabil transfizierten 5L-Zellen (Abb.23).



**Abb.23: Der Bereich zwischen den Positionen -1609 und -1312 des Kip1-Promotors reicht aus um TCDD-Induktion zu vermitteln.**

5x10<sup>6</sup> 5L-Zellen mit stabil integriertem Kip1<sub>-16/13</sub>-Reportergenkonstrukt wurden auf vier 60 cm<sup>2</sup> Kulturschalen verteilt und für die angegebenen Zeiten in Gegenwart von 1 nM TCDD oder 0,1% DMSO kultiviert. Die Induktion durch TCDD ergibt sich aus dem Verhältnis der Luciferaseaktivität von TCDD-behandelten zu DMSO-behandelten Zellen und ist als Mittelwert ± Streuung (1,95 ± 0,07 nach 24 h und 1,75 ± 0,35 nach 48 h), ermittelt aus zwei unabhängigen Experimenten, angegeben.

Kip1<sub>-16/13</sub>-Luz.: Luziferasereportergenkonstrukt, das den zwischen den Positionen -1609 und -1312 gelegenen Kip1-Promotorbereich enthält und stabil in 5L-Zellen integriert wurde.

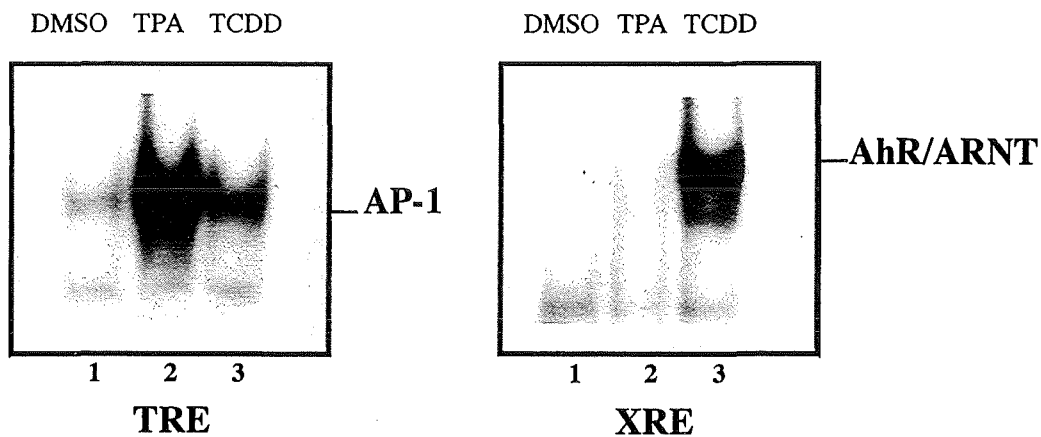
Das -1609/-1312 Element ist also nicht nur essentiell für die TCDD-Wirkung auf den Kip1-Promotor, sondern ebenso alleine ausreichend um TCDD-Aktivierbarkeit im heterologen Promotorkontext zu vermitteln. Somit ist das -1609/-1312-Element also nicht lediglich die Voraussetzung dafür, daß TCDD über ein anderes Element im Kip1-Promotor wirken kann, sondern ein direktes Ziel für den AhR.

### 4.3 Einfluß von TCDD auf die Signaltransduktion zu AP-1

Die zur AP-1-Aktivierung führende Signaltransduktion spielt eine wesentliche Rolle bei der Differenzierung und Proliferation von Zellen (Angel und Karin, 1991; Marshall, 1995; Göttlicher *et al.*, 1997b). Zumeist wurde von einer positiven Wirkung der zu AP-1 führenden Signaltransduktionskaskade auf die Zellproliferation ausgegangen. Diese Annahme wird mittlerweile jedoch durch viele Beispiele von proliferationshemmenden Wirkungen dieser Signaltransduktionskaskaden widerlegt. Die Beeinflussung der zu AP-1 führenden Signaltransduktionskaskaden durch TCDD (siehe Einleitung) könnte somit Anhaltspunkte für die proliferationshemmenden TCDD-Wirkungen in 5L-Zellen bieten. Parallel zur Analyse der TCDD-Effekte auf die grundlegenden Prozesse in der G1-S-Progression (siehe 4.2) wurden deshalb auch die TCDD-Wirkungen auf diese Signalwege untersucht.

#### 4.3.1 TCDD induziert AP-1-Aktivität in 5L-Zellen

In verschiedenen Mauseberzelllinien konnte AP-1-Aktivierung nach TCDD beobachtet werden (Puga *et al.*, 1992; Münzel *et al.*, 1996), deren Mechanismus allerdings bisher nicht verstanden ist. Zunächst sollte überprüft werden, ob TCDD auch in den aus der Ratte stammenden 5L-Zellen AP-1 aktiviert.



**Abb.24: TCDD erhöht die DNA-Bindungsaktivität von AP-1 in 5L-Zellen**

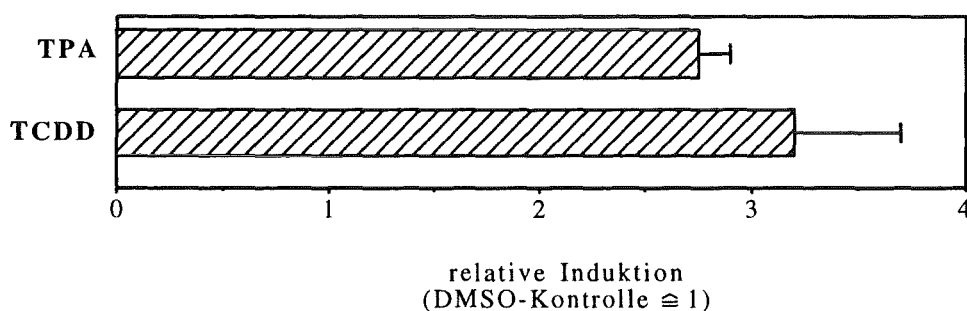
Logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden 2 h in Gegenwart von 1 nM TCDD oder 0,1% DMSO bzw. 30 min. in Gegenwart von 100 ng/ml TPA kultiviert. Für eine „Band-Shift“-Analyse wurden Kernextrakte dieser Zellen mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid, kodierend für entweder das AP-1- bzw. das AhR/ARNT-DNA-Bindemotiv (TRE bzw. XRE), versetzt. Der erhaltene Reaktionsmix wurde mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Trocknen des Gels wurde ein Autoradiogramm angefertigt.

TRE: TPA responsives Element, XRE: Xenobiotika responsives Element.

Die Aktivierung von AP-1 erfolgt zum einen durch die erhöhte Transkription der Gene der unterschiedlichen AP-1-Mitglieder, die zu einer gesteigerten AP-1-Proteinmenge führt. Zum anderen wird AP-1 durch induzierbare posttranslationelle Modifikationen (hauptsächlich durch Phosphorylierung) als Transkriptionsfaktor aktiviert. Erhöhte AP-1-Aktivität läßt sich durch verstärkte AP-1-Bindung an seine DNA-Bindungsmotive oder durch die Induktion eines in seiner Aktivität von AP-1-abhängigen Reportergens messen.

Zunächst wurde die Beeinflussung der mRNAs der AP-1-Mitglieder *c-jun* und *c-fos* durch TCDD-Gabe in 5L-Zellen untersucht. Beide mRNAs sind in 5L-Zellen über den gesamten Zeitraum von 5 h durch TCDD induziert (Abb.29, A). Die durch TCDD verursachte Induktion folgt somit nicht der durch die meisten anderen AP-1-Aktivatoren bewirkten transienten Induktionskinetik.

Ob die durch TCDD erhöhten AP-1 mRNA Spiegel auch mit einer erhöhten AP-1-Aktivität in 5L-Zellen verbunden sind, wurde als nächstes überprüft. Sowohl die an ein radioaktiv markiertes AP-1-Element gebundene AP-1-Menge (Abb.24, vgl. Spur 1 und 3) als auch die Aktivität eines AP-1-abhängigen Reportergens (Abb.25) wird durch TCDD erhöht. Die durch TCDD induzierte DNA-Bindungsaktivität ist deutlich geringer als die durch TPA induzierte DNA-Bindungsaktivität (Abb.24, vgl. Spur 2 und 3). Die Aktivierung des Reportergens ist jedoch vergleichbar (siehe Abb.25). Dies könnte durch die Induktionsdauer der *c-Jun*- und *c-Fos*-mRNAs durch TCDD erklärt werden. TCDD führt im Vergleich zu TPA zu einer schwächeren, aber dafür langfristigen Aktivierung von AP-1 (siehe Abb.29, A). Über die Dauer eines Reportergenexperimentes könnten beide Typen der Induktion zur Akkumulation vergleichbarer Luziferasemengen führen.

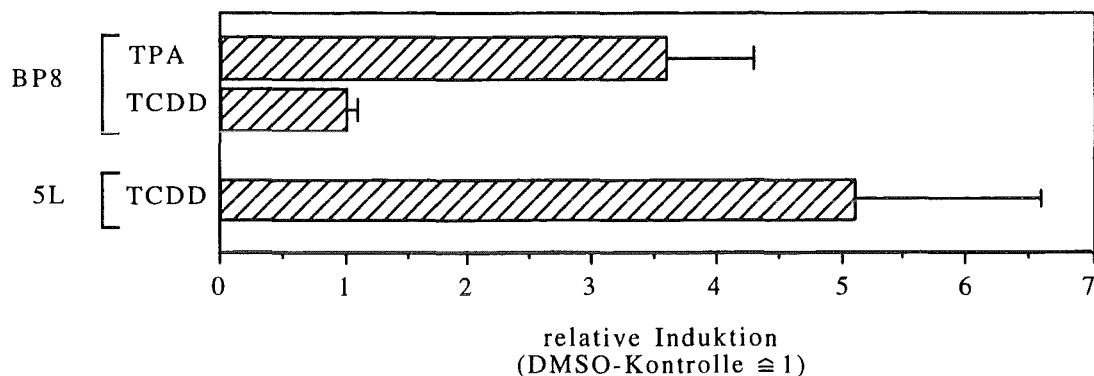


**Abb.25: TCDD aktiviert ein AP-1-abhängiges Reportergen in 5L-Wildtypzellen.**

$1,5 \times 10^7$  logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden mit  $30 \mu\text{g}$  -73-Coll-Luziferasereporterplasmid mittels Elektroporation transient transfiziert, in 30 ml Medium resuspendiert und auf drei Kulturschalen verteilt. Nach 2 h wurde das Standardkulturmedium durch serumreduziertes Medium (0,5% FCS) ersetzt, dem entweder 1 nM TCDD, 100 ng/ml TPA- bzw. 0,1% DMSO als Lösungsmittelkontrolle zugesetzt wurde. Die Luziferaseaktivität wurde 24 h später bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden auf den Proteingehalt der gemessenen Extrakte, der durch die Behandlungen unbeeinflusst war, normalisiert. Die Induktion durch TCDD bzw. TPA ergibt sich aus dem Verhältnis der Luziferaseaktivität von TCDD- bzw. TPA-behandelten zu DMSO-behandelten Zellen und ist als Mittelwert  $\pm$  Streuung aus zwei unabhängigen Experimenten angegeben.

### 4.3.2 Der AhR vermittelt die AP-1-Aktivierung durch TCDD

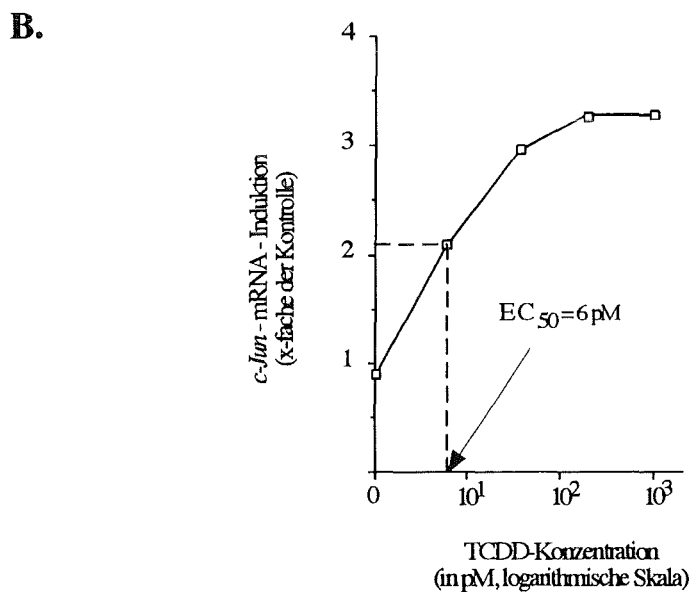
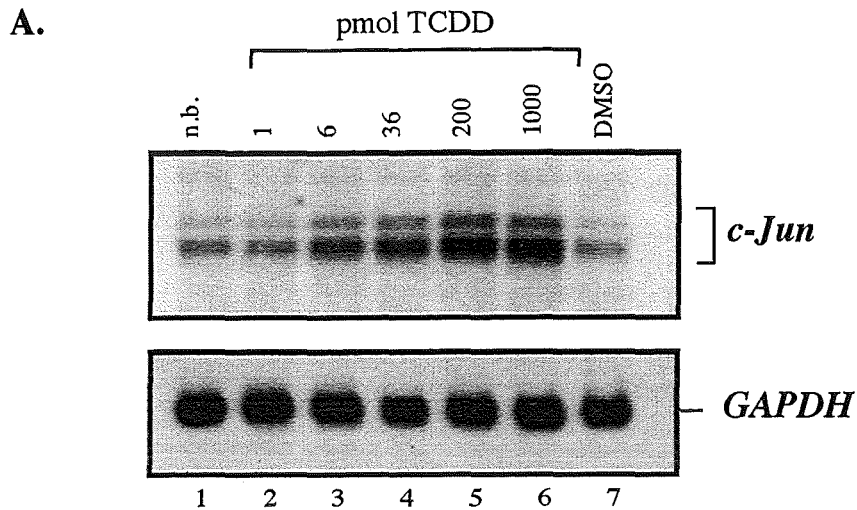
Die meisten, wenn nicht alle, Wirkungen von TCDD werden durch den AhR vermittelt. Zur Klärung der Rolle des AhR bei der AP-1-Aktivierung in 5L-Zellen wurde zunächst die Induzierbarkeit eines AP-1-abhängigen Reporterogenkonstrukts in den AhR-defizienten BP8<sup>AhR</sup>-Zellen mit der in 5L-Wildtypzellen verglichen. TCDD-Behandlung erhöht nicht die Reporterogenaktivität in den BP8<sup>AhR</sup>-Zellen (Abb.26). Die Induktion des Reporterogens durch TPA in den BP8<sup>AhR</sup>-Zellen zeigt, daß in diesen Zellen kein prinzipieller Defekt in der AP-1-Aktivierbarkeit vorliegt (Abb.26).



**Abb.26: TCDD aktiviert ein AP-1-abhängiges Reporterogen in 5L-Wildtypzellen, jedoch nicht in den AhR-defizienten BP8<sup>AhR</sup>-Zellen.**

$1 \times 10^7$  logarithmisch wachsende Zellen wurden mit 20  $\mu\text{g}$  -73-Coll-Luziferasereporterplasmid mittels Elektroporation transient transfiziert, in 20 ml Medium resuspendiert und auf zwei Kulturschalen verteilt. Nach 2 h wurde das Standardkulturmedium durch serumreduziertes Medium (0,5% FCS) ersetzt, dem entweder 1 nM TCDD bzw. 100 ng/ml TPA oder 0,1% DMSO als Lösungsmittelkontrolle zugesetzt wurde. Die Luziferaseaktivität wurde 24 h später bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden auf den Proteingehalt der gemessenen Extrakte, der durch die Behandlungen unbeeinflusst war, normalisiert. Die Induktion durch TCDD bzw. TPA ergibt sich aus dem Verhältnis der Luziferaseaktivität von TCDD- bzw. TPA-behandelten zu DMSO-behandelten Zellen und ist als Mittelwert  $\pm$  Streuung aus zwei unabhängigen Experimenten angegeben.

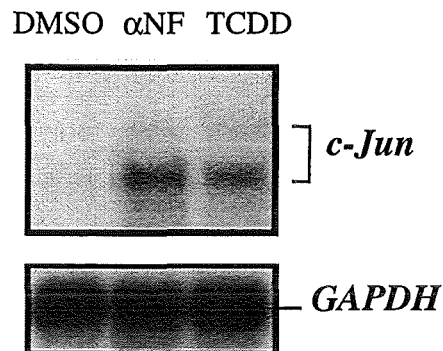
Um einen zweiten Hinweis für die Beteiligung des AhR an den TCDD-Effekten auf AP-1 zu erhalten, wurde die Induzierbarkeit eines Mitglieds aus der AP-1-Familie (c-Jun) durch verschiedene TCDD-Konzentrationen überprüft und mit den bekannten Dosis/Wirkungsbeziehungen anderer AhR-regulierter Zielgene verglichen. Die abgeschätzte TCDD-Konzentration, die zur halbmaximalen Aktivierung des c-Jun-Gens führt, beträgt ca. 6 pM (siehe Abb.27). Diese Konzentration entspricht der für AhR-abhängige Effekte beschriebenen TCDD-Konzentration, wie z.B. die Induktion AhR-abhängiger Zielgene, (Göttlicher *et al.*, 1990).



**Abb.27: Dosisabhängigkeit der *c-Jun*-mRNA-Induktion durch TCDD in 5L-Zellen.**

(A) Logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden für 24 h mit den angegebenen TCDD-Dosen bzw. 0,1% DMSO enthaltendem Medium inkubiert. Zur Northern-Blot-Analyse wurden je 2 µg Poly(A)+RNA verwendet. Zur Sicherstellung gleichmäßig geladener RNA-Mengen wurde die Membran mit einer für *GAPDH* kodierenden Sonde rehybridisiert. Die Signale der *c-Jun*-mRNA wurden zum Ausgleich unterschiedlich geladener RNA-Mengen auf die *GAPDH*-Signale normalisiert und graphisch dargestellt. (B) Die abgeschätzte TCDD-Dosis, die zur halbmaximalen Induktion (EC<sub>50</sub>) der *c-Jun*-mRNA führt, beträgt ca. 6 pM.

Als dritte Evidenz, daß der aktivierte AhR zur AP-1-Induktion führt, dient die Induktion der *c-Jun*-mRNA durch einen anderen AhR-Liganden, der strukturell nur wenig Ähnlichkeiten mit TCDD aufweist, das  $\alpha$ -Naphthoflavon ( $\alpha$ NF), (Abb.28).

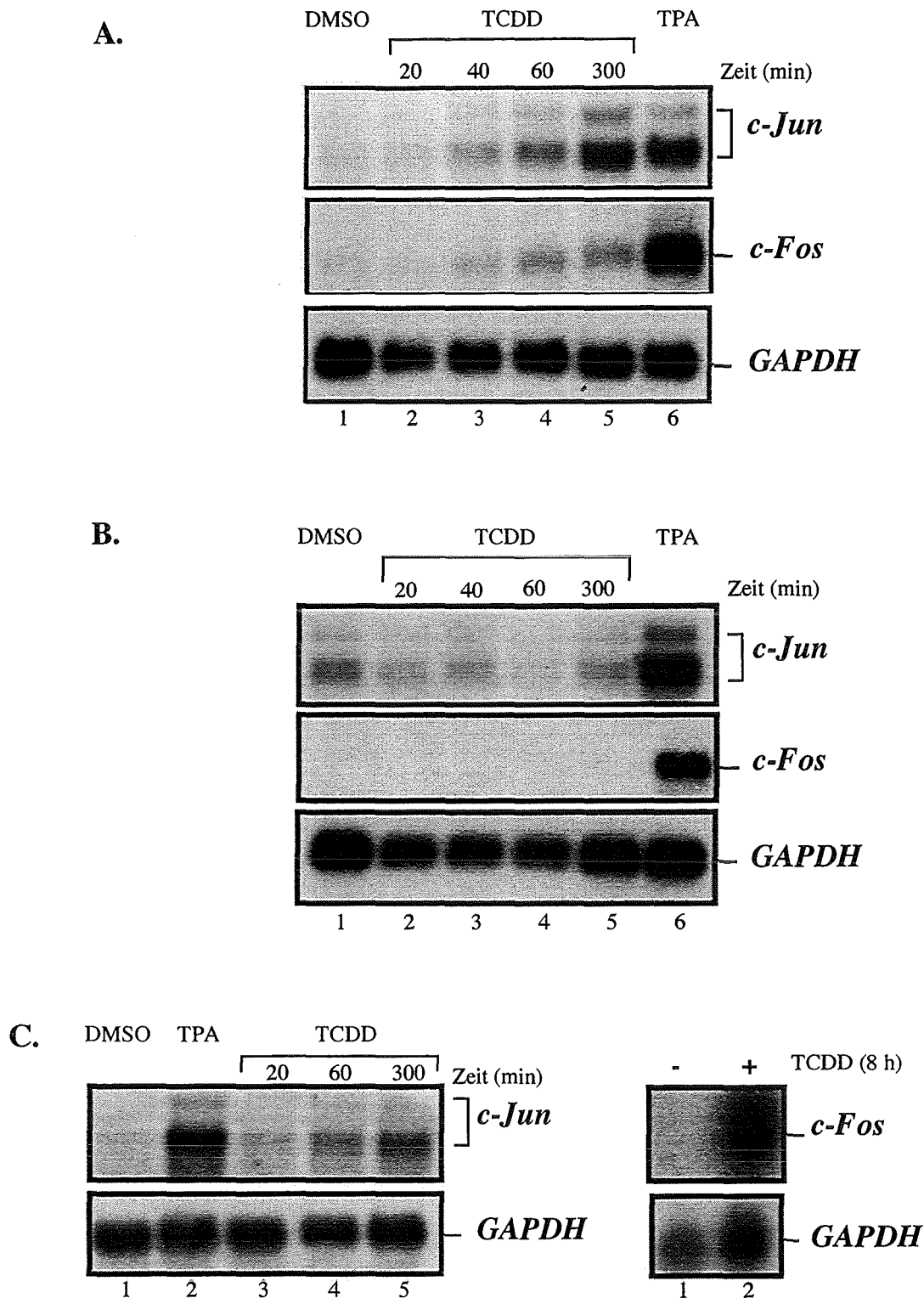


**Abb.28: TCDD und  $\alpha$ NF induzieren *c-Jun*-mRNA in 5L-Zellen.**

Subkonfluent gewachsene 5L-Zellen wurden für 14-18 h in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend für weitere 5 h in Gegenwart von 1 nM TCDD bzw. 20  $\mu$ M  $\alpha$ NF kultiviert. Zur Northern-Blot-Analyse wurden je 10  $\mu$ g Poly(A)+RNA verwendet. Zur Sicherstellung gleichmäßig geladener RNA-Mengen wurde die Membran mit einer für *GAPDH* kodierenden Sonde rehybridisiert.

Um die strikte AhR-Abhängigkeit der AP-1-Aktivierung zu bestätigen, wurde die Induktion der *c-Jun*- und der *c-Fos*- mRNAs in den 5L-Wildtyp-, BP8<sup>AhR-</sup>- und BP8<sup>AhR+</sup>-Zellen verglichen. In den BP8<sup>AhR-</sup>-Zellen kann TCDD weder die mRNA des *c-Fos*- noch des *c-Jun*- Gens induzieren (Abb.29, B.). Nach Rekonstitution der AhR-Expression in den BP8<sup>AhR-</sup>-Zellen kann in den als BP8<sup>AhR+</sup>-Zellen bezeichneten Zellen auch die *c-Jun*- und *c-Fos*-mRNA-Induktion wieder beobachtet werden (Abb.29, C.).





**Abb.29: Die Induktion von *c-Jun*- und *c-Fos*-mRNA durch TCDD ist AhR-abhängig.**

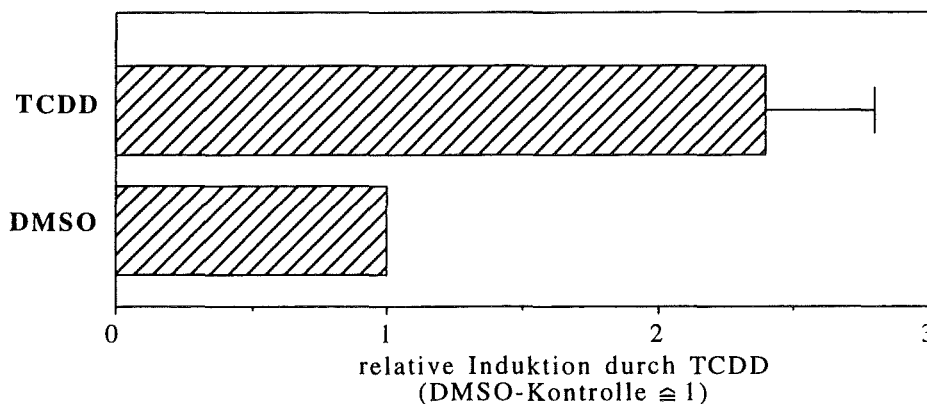
Subkonfluent wachsende 5L-, BP8<sup>AhR-</sup>- bzw. BP8<sup>AhR+</sup>-Zellen wurden für 14-18 h in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend für die angegebenen Zeiten mit 1 nM TCDD bzw. 0,1% DMSO oder 40 min mit 100 ng/ml TPA haltigem Medium inkubiert. Zur Northern-Blot-Analyse wurden je 10 µg Poly(A)+RNA verwendet. Zur Sicherstellung gleichmässig geladener RNA-Mengen wurde die Membran mit einer für *GAPDH* kodierenden Sonde rehybridisiert.

(A) Zeitabhängigkeit der *c-Jun*- und *c-Fos*-mRNA-Induktion durch TCDD in 5L-Zellen. (B) TCDD-Behandlung bewirkt keine *c-Jun*- und *c-Fos*-mRNA-Induktion in den AhR-defizienten BP8<sup>AhR-</sup>-Zellen. (C) Partielle Rekonstitution der *c-Jun*- und *c-Fos*- mRNA-Induktion durch TCDD in BP8<sup>AhR+</sup>-Zellen.

### 4.3.3 TCDD aktiviert einen Integrator von Signaltransduktionskaskaden - den *c-Fos*-Promotor

Eine erhöhte mRNA-Menge kann durch einen verzögerten Abbau der mRNA (Stabilisierung) erfolgen oder durch eine erhöhte Genexpression bewirkt werden. Ob TCDD die Expression des *c-Jun*- bzw. des *c-Fos*-Gens induzieren kann, wurde durch die Verwendung von *c-Jun*- bzw. *c-Fos*-Promotor-Reportergenkonstrukten überprüft.

Ein die wesentlichen Kontrollelemente enthaltender Promotorbereich des *c-Fos*-Gens (von Position -711 bis +45) wurde vor das Luziferasereporter gen kloniert (zur Verfügung gestellt von Martin Göttlicher) und hinsichtlich seiner Aktivierbarkeit durch TCDD analysiert. In 5L-Zellen induziert TCDD das *c-Fos*-Promotorkonstrukt (Abb.30). Zusätzlich zur Aktivierung des *c-Fos*-Promotors aktiviert TCDD auch ein minimales *c-Jun*-Promotorkonstrukt (bis zur Position -196 des humanen *c-Jun*-Promotors, Daten nicht gezeigt). Die Induktion des *c-Jun*-Promotors ist jedoch außer durch die direkte Aktivierung durch TCDD auch durch eine indirekte Aktivierung durch *c-Jun* selbst erklärbar. An die Promotorelemente *jun1* und *jun2* (siehe Einleitung) kann *c-Jun* selbst binden und seine eigene Expression verstärken. TCDD kann also sowohl den *c-Jun*- als auch den *c-Fos*-Promotor aktivieren und erhöht dadurch wahrscheinlich die mRNA-Mengen von *c-Jun* und *c-Fos*.



**Abb.30: TCDD aktiviert den *c-Fos*-Promoter.**

Je  $1,25 \times 10^5$  logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden mit je  $1 \mu\text{g}$  Fos<sub>-711/+45</sub>-Luziferasereporter genplasmid mittels Lipid-vermittelter Transfektion (Lipofektion) transient transfiziert. Die Zellen wurden anschließend 24 h in Gegenwart von 1 nM TCDD- oder 0,1% DMSO in serumreduziertem Medium (0,5 % FCS) kultiviert. Die erhaltenen Luziferasewerte wurden durch die Koftransfektion von je 0,1 mg eines für die Renilla-Luziferase kodierenden Expressionsplasmids, dessen Expression durch TCDD unbeeinflusst ist, normalisiert. Die Induktion ergibt sich aus dem Verhältnis der nach TCDD- bzw. DMSO-Behandlung erhaltenen normalisierten Werte. In jedem Experiment wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Abbildung zeigt das Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  Streuung).

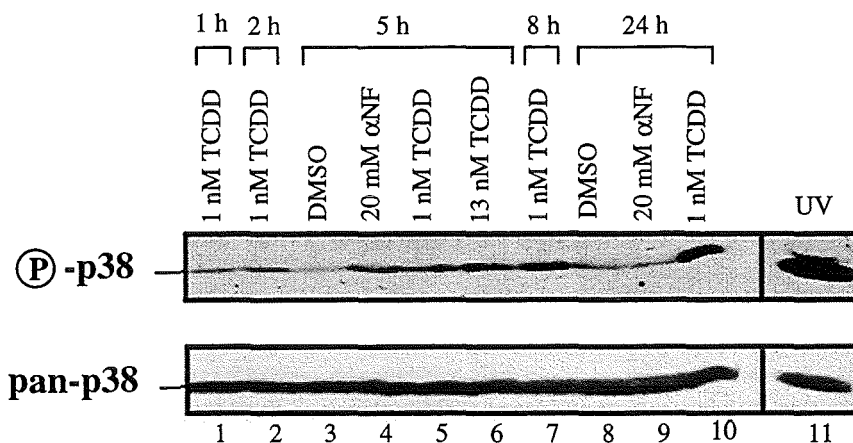
Die Aktivierung des *c-Fos*-Promotors durch TCDD folgt nicht dem „klassischen“ Prinzip der TCDD-Wirkung, da sich in dem verwendeten Bereich des *c-Fos*-Promotors keine XRE-Sequenzen befinden. Die hauptsächliche Kontrolle dieses Promotorbereichs erfolgt durch

die MAP-Kinasekaskaden, weshalb im folgenden Effekte von TCDD auf diese Signaltransduktionskaskaden getestet wurden.

#### 4.3.4 Die p38-MAPK wird dauerhaft und AhR-abhängig durch TCDD aktiviert

Die MAP- (engl. *mitogen activated protein*) Kinasen teilen sich ein in die drei Unterfamilien der ERK- (engl. *extracellular signal regulated kinase*), der JNK- (engl. *Jun-N-terminal Kinase*) und der p38-MAP-Kinasen. Zur schnellen, indirekten Aktivitätsbestimmung der MAP-Kinasen wurden Antikörper verwendet, die spezifisch die aktivierte phosphorylierte Form der jeweiligen MAP-Kinase erkennen. Die durch die MAPK-Kinasen phosphorylierten MAP-Kinasen sind die aktiven Formen, weshalb der Nachweis der Phosphorylierung der MAP-Kinase mit ihrer katalytischen Aktivität korreliert. Fast alle Induktoren der MAP-Kinasen aktivieren diese transient und führen ebenfalls nur zu einer transienten Induktion der Zielgene *c-Jun* und *c-Fos* (Marshall, 1995; Minden und Karin, 1997; Whitmarsh und Davis, 1996 und 1998).

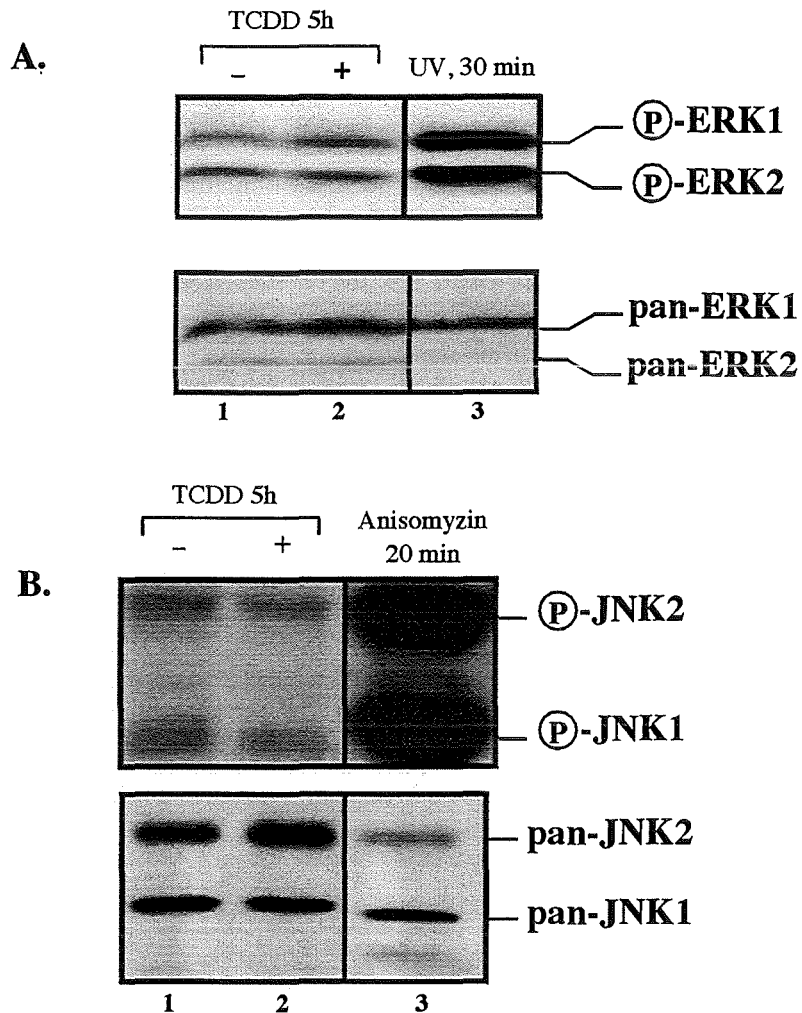
Zunächst sollte überprüft werden, ob TCDD zu einer kurzfristigen Aktivierung der MAP-Kinasen (ERK, JNK, p38) führt. Außer einer schwachen, jedoch nicht in allen Experimenten reproduzierbaren, Aktivierung der JNK in den ersten 30 Minuten konnte keine Steigerung der MAP-Kinase-Aktivität nach TCDD-Behandlung gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb.31: Zeitlicher Verlauf der p38-MAPK-Aktivierung durch TCDD und  $\alpha$ NF.**

Subkonfluent gewachsene 5L-Zellen wurden für 12-16 h in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend für die angegebenen Zeiten in Gegenwart von 1 nM bzw. 13 nM TCDD, 20 mM  $\alpha$ NF oder 0,1% DMSO inkubiert. Zum Vergleich wurden die Zellen mit UVC ( $30\text{J}/\text{m}^2$ ) bestrahlt und anschließend weitere 30 min in Medium inkubiert. Die Menge an phosphorylierter p38-MAPK wurde mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines für Phospho-p38-MAPK spezifischen Antikörpers bestimmt. Zur Sicherstellung gleichmäßig geladener Proteinmengen wurde die Membran mit einem nicht phosphospezifischen, alle p38-MAPK-Isoformen erkennenden Antikörper rehybridisiert. UV: ultraviolette Strahlung.

Untersucht man die Aktivierung der MAP-Kinasen durch TCDD über einen Zeitraum von mehreren Stunden, ist jedoch die kontinuierliche Steigerung der p38-MAPK- (Abb.31, vgl. Spur 3 und 5 bzw. Spur 8 und 10), jedoch nicht die der ERK1/2- bzw. JNK1/2-Phosphorylierung (Abb.32, vgl. Spur 1 und 2) meßbar.



**Abb.32: TCDD bewirkt keine prolongierte Aktivierung der JNKs und der ERKs.**

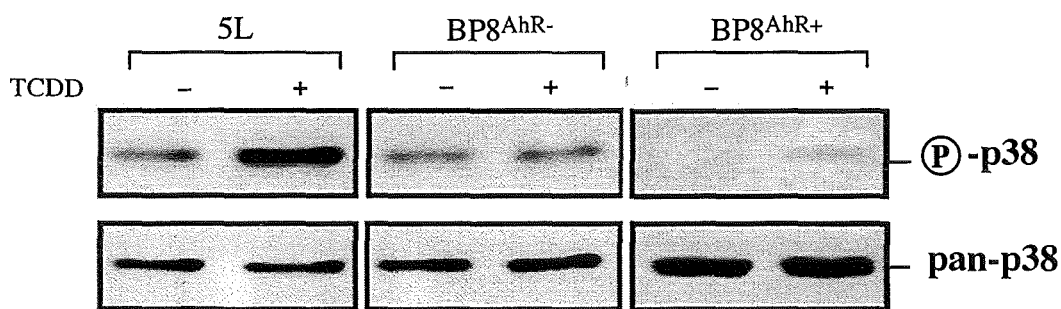
Logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden für 5 h in Gegenwart von 1 nM TCDD bzw. 0,1% DMSO kultiviert. Zum Vergleich wurden die Zellen in (A) mit UVC (30J/m<sup>2</sup>) bestrahlt und anschließend weitere 30 min in Medium inkubiert oder in (B) für 20 min in Gegenwart von 10 µg/ml Anisomyzin kultiviert. Die Menge an phosphorylierter ERK1/2 bzw. JNK1/2 wurde mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines für Phospho-ERK (A) bzw. Phospho-JNK (B) spezifischen Antikörpers bestimmt. Zur Sicherstellung gleichmäßig geladener Proteinmengen wurde die Membran mit einem nicht phosphospezifischen gegen ERK1/2 (pan-ERK) bzw. gegen JNK1/2 (pan-JNK) gerichteten Antikörper rehybridisiert. UV: ultraviolette Strahlung

Die ausschließliche und persistente Aktivierung der p38-MAPK durch TCDD weicht völlig von den bisher beschriebenen MAPK-Aktivierungen durch andere Induktoren ab. Diese induzieren MAPKs hauptsächlich transient. Die einzigen bekannten Ausnahmen sind die Phosphatasehemmer und Tumorpromotoren Ocadaic Acid und Arsenit, die eine lang anhaltende Induktion der MAP-Kinasen bewirken. Außerdem sind im Gegensatz zu TCDD die bekannten

Induktoren normalerweise entweder preferentielle Aktivatoren der ERK1/2 oder aktivieren vorrangig die beiden Streßkinasen JNK und p38-MAPK.

Außer TCDD kann auch ein zweiter AhR-Ligand,  $\alpha$ NF, die p38-MAPK aktivieren. Die durch  $\alpha$ NF bewirkte Kinetik ist jedoch nur transient, klingt nach 8 h wieder ab (Abb.31, vgl. Spur 3 und 4 bzw. Spur 8 und 9) und ist möglicherweise durch den intrazellulären Abbau dieser Substanz erklärbar.

Um die AhR-Abhängigkeit der p38-MAPK-Aktivierung durch TCDD zu überprüfen, wurde diese in 5L-Wildtyp-, BP8<sup>AhR-</sup>- und BP8<sup>AhR+</sup>-Zellen untersucht. Im Gegensatz zu der p38-MAPK-Aktivierung in 5L-Wildtypzellen (Abb.33, Links) kann in den AhR-defizienten BP8<sup>AhR-</sup>-Zellen keine p38-MAPK-Aktivierung beobachtet werden (Abb.33, Mitte). In den in ihrer AhR-Expression rekonstituierten BP8<sup>AhR+</sup>-Zellen führt TCDD wieder zur Aktivierung der p38-MAPK (Abb.33, Rechts). Somit ist die Anwesenheit des AhR die Voraussetzung für die p38-MAPK-Aktivierung durch TCDD.



**Abb.33: Die Aktivierung der p38-MAPK durch TCDD ist AhR-abhängig.**

Logarithmisch wachsende 5L-, BP8<sup>AhR-</sup>- und BP8<sup>AhR+</sup>-Zellen wurden für 24 h in Gegenwart von 1 nM TCDD bzw. 0,1% DMSO kultiviert. Die Menge an phosphorylierter p38-MAPK wurde mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines für Phospho-p38-MAPK spezifischen Antikörpers bestimmt. Zur Sicherstellung gleichmäßig geladener Proteinmengen wurde die Membran mit einem nicht phosphospezifischen gegen alle p38-MAPK-Isoformen gerichteten Antikörper rehybridisiert.

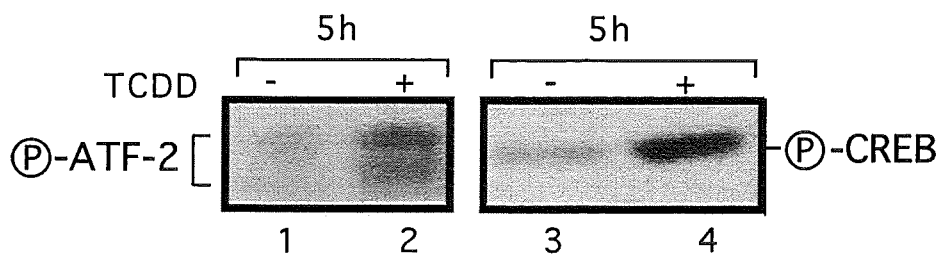
#### 4.3.5 TCDD aktiviert die durch die p38-MAPK regulierten Transkriptionsfaktoren CREB, ATF-2 und ELK-1

Aktiviert MAP-Kinasen verstärken die Phosphorylierung in den Transaktivierungsdomänen (kurz: TAD) der durch sie regulierten Transkriptionsfaktoren. Diese Phosphorylierung ist für die Aktivität dieser Faktoren notwendig. Somit sollte TCDD sowohl zu einer erhöhten Phosphorylierung als auch zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität der durch die p38-MAPK regulierten Transkriptionsfaktoren führen. Exemplarisch wurde die

Aktivierung der Transkriptionsfaktoren ATF-2 (engl. *activating transcription factor-2*), ELK-1 (engl. *ets like protein*) und CREB (engl. *cyclic AMP responsive element binding protein*) nach TCDD-Behandlung untersucht, da für diese eine zentrale Rolle in der Transkriptionskontrolle der auch durch TCDD regulierten Proto-Onkogene *c-Jun* und *c-Fos* beschrieben ist (siehe Einleitung).

Zuerst wurde der TCDD-Einfluß auf die Phosphorylierung der Transaktivierungsdomänen von CREB bzw. ATF-2 analysiert. Dies erfolgte durch Verwendung phosphospezifischer Antikörper, die spezifisch die phosphorylierten Aminosäuren Serin an der Position 133 des CREB-Proteins bzw. Threonin an der Position 71 des ATF-2-Proteins erkennen.

Sowohl CREB (Abb.34, vgl. Spur 5 und 6) als auch ATF-2 (Abb.34, vgl. Spur 1 und 2 bzw. Spur 3 und 4) wird nach TCDD-Gabe in der Transaktivierungsdomäne verstärkt phosphoryliert.

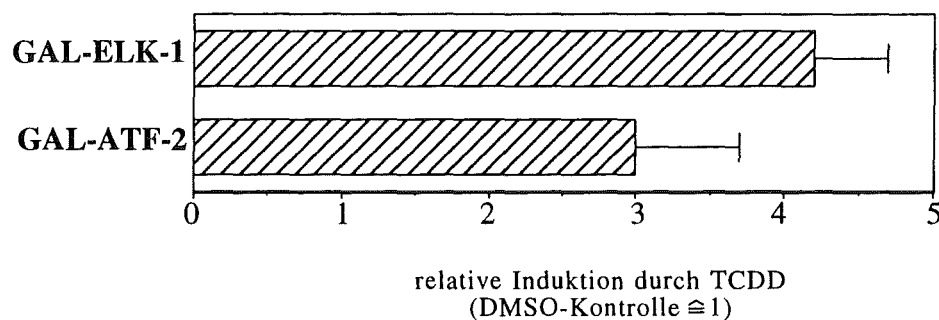


**Abb.34: Die beiden durch die p38-MAPK regulierten Transkriptionsfaktoren ATF-2 und CREB werden durch TCDD aktiviert.**

Logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden für 5 h in Gegenwart von 1 nM TCDD bzw. 0,1% DMSO kultiviert. Die Menge an phosphoryliertem ATF-2 bzw. CREB wurde mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines für Phospho-ATF-2 (linker Teil) bzw. Phospho-CREB (rechter Teil) spezifischen Antikörpers bestimmt. Zur Sicherstellung gleichmäßig geladener Proteinmengen wurde ein Teil des Gels mit Coomassie-Blau gefärbt (nicht gezeigt).

Ob TCDD auch funktionell zu einer gesteigerten Transaktivierung der durch die p38-MAPK regulierten Transkriptionsfaktoren führt, wurde anhand der Beispiele ELK-1 und ATF-2 näher untersucht. Durch Fusion der Transaktivierungsdomänen von ELK-1 bzw. von ATF-2 an die heterologe DNA-Bindungsdomäne des Hefetranskriptionsfaktors GAL 4 entstehen Hybridproteine, die an die für GAL 4 charakteristischen DNA-Bindungsmotive im Promotor eines Reportergens binden können. Wird die TAD von ELK-1 bzw. ATF-2 phosphoryliert, so ist dies durch eine erhöhte Aktivität des Reportergens meßbar.

Die Aktivität beider Hybridproteine, GAL-ELK-1 und GAL-ATF-2, wird durch TCDD gesteigert (Abb.35).

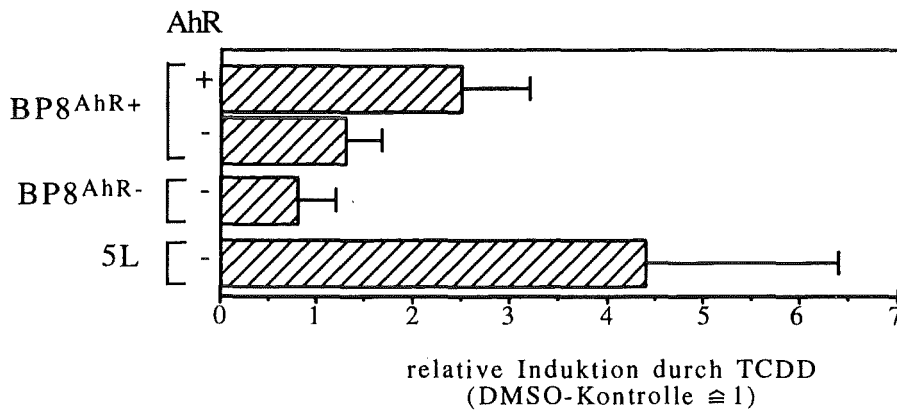


**Abb.35:** Die Transaktivierungsdomänen der beiden durch p38-MAPK regulierten Transkriptions-faktoren ELK-1 und ATF-2 werden durch TCDD aktiviert.

Je  $1,25 \times 10^5$  logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden mit je  $0,5 \mu\text{g}$  GAL-abhängigem-Luziferasereporterplasmid und zusätzlich mit je  $0,5 \mu\text{g}$  Expressionsplasmid kodierend für GAL-ELK1 bzw. GAL-ATF-2 mittels Lipid-vermittelter Transfektion (Lipofektion) transient transfiziert. Nach Inkubation mit  $1 \text{ nM}$  TCDD- oder  $0,1\%$  DMSO- haltigem, serumfreiem Medium für 24 h wurde die Luziferaseaktivität von je zwei identisch mit DMSO- bzw. TCDD-behandelten Ansätzen bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden durch die Kotransfektion von je  $0,1 \mu\text{g}$  eines für die Renilla-Luziferase kodierenden Expressionsplasmids, dessen Expression durch TCDD unbeeinflusst ist, normalisiert. Die Induktion ergibt sich aus dem Verhältnis der nach TCDD- bzw. DMSO-Behandlung erhaltenen normalisierten Werte. Die Abbildung zeigt das Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Da die Aktivierung der p38-MAPK durch TCDD AhR-abhängig ist, sollte dies ebenso für die durch sie regulierten Transkriptionsfaktoren gelten. Dies wurde anhand der ELK-1 Aktivierung in 5L-, BP8<sup>AhR-</sup>- und BP8<sup>AhR+</sup>-Zellen überprüft.

TCDD aktiviert ELK-1 in 5L-Zellen (Abb.36, Unten), jedoch nicht in BP8<sup>AhR-</sup>-Zellen (Abb.36, Mitte). In den BP8<sup>AhR+</sup>-Zellen ist ELK-1 wieder, wenn auch weniger effizient als in den 5L-Zellen, aktivierbar. Durch Koexpression des AhR kann die ELK-1-Aktivierung in den BP8<sup>AhR+</sup>-Zellen zusätzlich gesteigert werden (Abb.36, Oben), ein Ergebnis, daß sich aufgrund der geringen und somit möglicherweise für die ELK-1-Aktivierung limitierenden AhR-Menge in diesen Zellen erklären läßt. Somit ist nach TCDD-Behandlung sowohl die Aktivierung der p38-MAPK als auch die Aktivierung des durch sie regulierten Transkriptionsfaktors ELK-1 abhängig vom AhR.



**Abb.36: Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors ELK-1 durch TCDD ist AhR-abhängig.**

Je  $1,25 \times 10^5$  logarithmisch wachsende Zellen wurden mit je  $0,5 \mu\text{g}$  GAL-abhängigem-Luziferasereporterplasmid,  $0,1 \mu\text{g}$  Expressionsplasmid kodierend für GAL-ELK-1 und  $0,4 \mu\text{g}$  Leervektor (pCMV5) mittels Lipid-vermittelter Transfektion (Lipofektion) transient transfiziert. Zur Steigerung der AhR-Menge in den BP<sup>AhR+</sup>-Zellen wurden statt  $0,4 \mu\text{g}$  Leervektor zusätzlich  $0,4 \mu\text{g}$  Expressionsplasmid kodierend für den AhR (pCMV5-AhR) kotransfiziert. Nach Inkubation mit  $1 \text{ nM}$  TCDD - oder  $0,1\%$  DMSO-haltigem Medium mit  $10\%$  FCS für  $24 \text{ h}$  wurde die Luziferaseaktivität von je zwei identisch mit DMSO- bzw. TCDD-behandelten Ansätzen bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden durch die Kotransfektion von je  $0,1 \mu\text{g}$  eines für die Renilla-Luziferase kodierenden Expressionsplasmids, dessen Expression durch TCDD unbeeinflusst ist, normalisiert. Die Induktion ergibt sich aus dem Verhältnis der nach TCDD- bzw. DMSO-Behandlung erhaltenen normalisierten Werte. Die Abbildung zeigt das Ergebnis von drei (für 5L- bzw. BP<sup>AhR+</sup>-Zellen) bzw. zwei (BP<sup>AhR+</sup>-Zellen) unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

#### 4.3.6 Die Aktivierung der p38-MAPK durch TCDD wird nicht durch Wachstumsfaktoren vermittelt

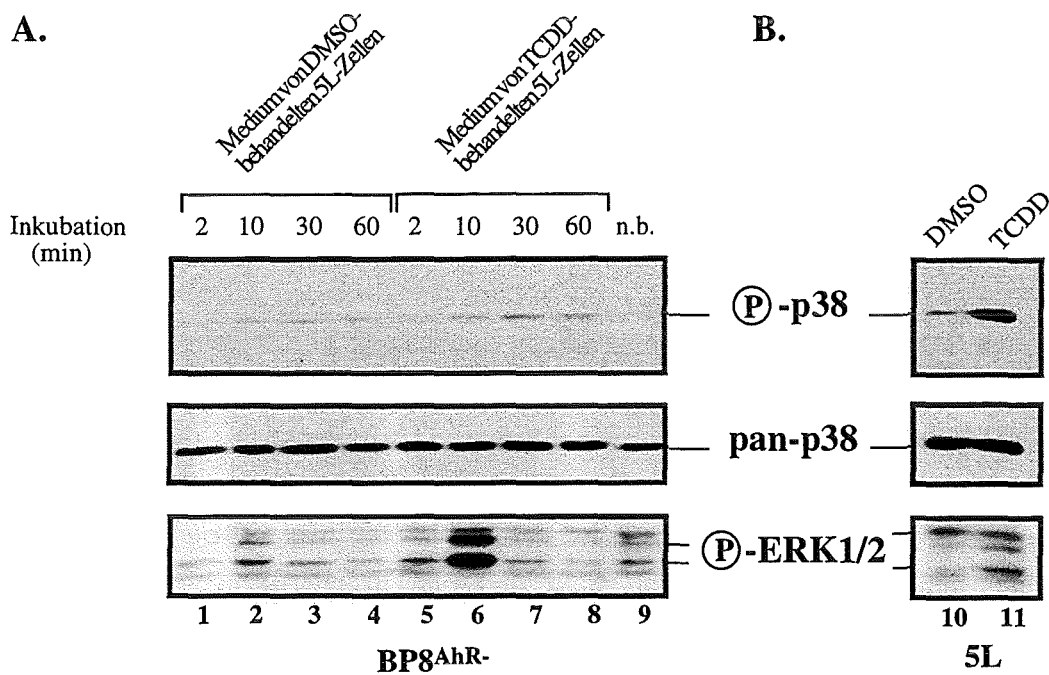
Wachstumsfaktorrezeptoren kommt eine zentrale Rolle bei der Regulation der MAPK-Aktivität zu (siehe Einleitung). Für ihre Aktivierung sind zwei voneinander unterscheidbare Mechanismen beschrieben - die „klassische“ Aktivierung durch Wachstumsfaktoren sowie die kürzlich gefundene „Aktivierung durch Inaktivierung“ (Knebel *et al.*, 1996). Die „klassische“ Aktivierung wird durch die Bindung der Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren erreicht. Die von der Zelle sezernierten Wachstumsfaktoren können zum einen auf sie selbst zurückwirken (autokrine Stimulation) oder aber auf umgebende Zellen wirken (parakrine Stimulation). „Aktivierung durch Inaktivierung“ wurde als neues Prinzip der Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren nach UV-Bestrahlung aber auch nach Tributylzinn (TBT) - Behandlung gefunden. Hierbei inaktiviert UV bzw. TBT die den Wachstumsfaktorrezeptor inaktivierende Phosphatase und führt dadurch indirekt zur Akkumulation des aktivierten (phosphorylierten) Rezeptors (A. Knebel und F. Zauke, pers. Mitteilung).

TCDD beeinflusst in anderen experimentellen Systemen die Expression verschiedener Wachstumsfaktoren (wie z.B.  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL}1\beta$ ,  $\text{TGF}\alpha$ ,  $\text{TGF}\beta$  (Denison *et al.*, 1998)), die als Aktivatoren der MAPK beschrieben sind (siehe Einleitung). Außerdem ist eine Reduktion des membranständigen EGF (engl. epidermal growth factor)-Rezeptors in Keratinozyten



(Madhukar *et al.*, 1984; Hudson *et al.*, 1985; Lin *et al.*, 1991) nach TCDD-Behandlung beschrieben.

Zunächst wurde getestet, ob TCDD in 5L-Zellen zur Sekretion MAPK-aktivierender Wachstumsfaktoren führt. 5L-Zellen wurden für 48 h mit TCDD behandelt, um eine ausreichend lange Zeit zur Akkumulation der potentiell sezernierten Wachstumsfaktoren im Zellkulturmedium zu gewährleisten. Anschließend wurde das so konditionierte, immer noch TCDD enthaltende Medium, von der 5L-Zellkultur auf BP8<sup>AhR</sup>-Zellen transferiert. TCDD kann in den AhR defizienten BP8<sup>AhR</sup>-Zellen nicht auf die p38-MAPK wirken (siehe Abb.33, Mitte). Dadurch ist es in den BP8<sup>AhR</sup>-Zellen möglich, die Aktivierung der ERK1/2 oder p38-MAPK durch von 5L-Zellen gegebenenfalls sezernierten Wachstumsfaktoren oder Zytokinen unabhängig von einer direkten TCDD-Wirkung zu messen.



**Abb.37: TCDD-Behandlung von 5L-Zellen bewirkt die Akkumulation eines ERK1/2- aber keines p38-MAPK aktivierenden Faktors im Zellkultur-Überstand.**

Logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden für 48 h in Gegenwart von 1 nM TCDD bzw. 0,1% DMSO kultiviert. (A) Phosphorylierung der p38- bzw. ERK1/2-MAPK nach 48 h DMSO- bzw. TCDD-Behandlung in den für Experiment (B) verwendeten 5L-Zellen. Die Menge an phosphorylierter p38-MAPK bzw. phosphorylierter ERK1/2 wurde mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines für Phospho-p38-MAPK bzw. Phospho-ERK1/2-MAPK spezifischen Antikörpers bestimmt. Zur Sicherstellung gleichmäßig geladener Proteinmengen wurde die Membran mit einem nicht phospho-spezifischen, alle p38-MAPK-Isoformen erkennenden Antikörper rehybridisiert. (B) Der Zellkultur-Überstand („konditioniertes Medium“) der in (A) behandelten 5L-Zellen wurde anschließend auf in vier Zellkulturschalen subkonfluent gewachsene BP8<sup>AhR</sup>-Zellen, die zuvor für 12-14 h in serumfreiem Medium inkubiert wurden, verteilt. Nach den angegebenen Zeiten wurde die Menge an phosphorylierter p38-MAPK bzw. phosphorylierter ERK1/2 wie unter (A) beschrieben bestimmt.

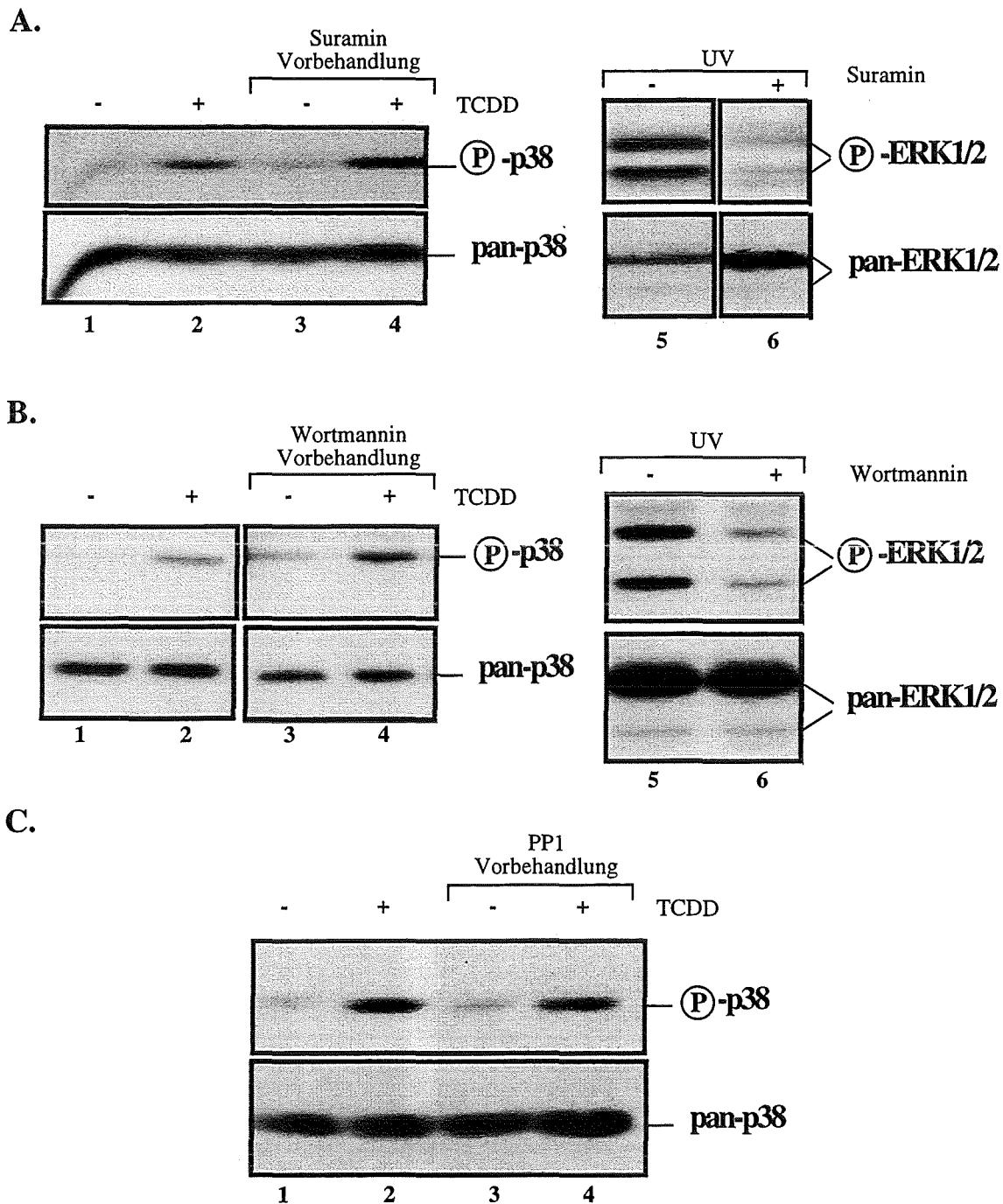
Die Inkubation der BP8<sup>Ahr</sup>-Zellen mit dem konditionierten Medium DMSO-behandelter 5L-Zellen bewirkt keine signifikante Aktivierung sowohl der ERK1/2 als auch der p38-MAPK (Abb.37, A., Spur 1 bis 4). Das konditionierte Medium von TCDD-behandelten 5L-Zellen hingegen führt 10 min nach Inkubation zu einem drastischen Anstieg der ERK1/2-, jedoch nicht der p38-MAPK -Aktivierung (Abb.37, A., vgl. Spur 2 und 6).

TCDD-behandelte 5L-Zellen sezernieren also eine Aktivität, die spezifisch auf den ERK1/2- nicht aber den p38-MAPK-Weg wirkt. Dies korreliert mit der nach 48 h TCDD-Behandlung erhöhten ERK1/2-Phosphorylierung in 5L-Zellen (Abb.37, B., vgl. Spur 10 und Spur 11). Dieser späte TCDD-Effekt ist z.B. nach 5 h TCDD-Gabe noch nicht feststellbar (siehe Abb.32), da zu frühen Zeitpunkten noch nicht genügend Wachstumsfaktoren im Medium akkumulieren konnten. Die von 5L-Zellen nach TCDD-Behandlung sezernierte Aktivität ähnelt der nach UVC-Bestrahlung von verschiedenen Zelllinien gefundenen, die ebenso präferentiell die ERK1/2 aktiviert und als EPIF (engl. *extra cellular protein synthesis inducing factor*) bezeichnet wurde (Schorpp *et al.*, 1984). Zwei in EPIF enthaltene Wachstumsfaktoren, die hauptsächlich ERK1/2 aktivieren, konnten als IL1 $\alpha$  (engl. *interleukine 1 $\alpha$* ) und bFGF (engl. *basic fibroblast growth factor*) identifiziert werden (Krämer *et al.*, 1993). Als ein möglicher Kandidat für die im durch TCDD konditionierten Medium enthaltenen Wachstumsfaktoren käme beispielsweise das durch TCDD regulierte TGF $\alpha$  in Frage, das ebenso präferentiell die ERK1/2 aktiviert (Gaido *et al.*, 1992).

Ob TCDD Wachstumsfaktorrezeptoren unabhängig von Wachstumsfaktoren aktiviert (wie für UV bzw. TBT oben beschrieben) können die eben beschriebenen Mediumtransferexperimente nicht ausschließen. Um dennoch die Beteiligung von Wachstumsfaktorrezeptoren an der TCDD-induzierten p38-MAPK Aktivierung auszuschließen, wurden diese zunächst mittels spezifischer Inhibitoren in ihrer Funktion gehemmt und anschließend die Aktivierung der p38-MAPK durch TCDD untersucht.

Vorbehandlung der Zellen mit Suramin, einem Inhibitor von Wachstumsfaktorrezeptoren, hat auf die durch TCDD bewirkte p38-MAPK Aktivierung keinen Effekt (Abb.38, A., vgl. Spur 1 und 2 mit Spur 3 und 4). Die von Wachstumsfaktorrezeptoren abhängige ERK1/2-Aktivierung durch UVC (Sachsenmaier *et al.*, 1994) ist jedoch in einem Parallelexperiment (Abb.38, A., vgl. Spur 5 und 6) ebenso wie die basale ERK1/2-Aktivität (nicht gezeigt) gehemmt.

Wortmannin, ein Inhibitor der durch Wachstumsfaktoren regulierten PI-3-Kinase, kann die TCDD-Wirkung auf die p38-MAPK auch nicht verhindern (Abb.38, B., vgl. Spur 1 und 2 mit Spur 3 und 4), verringert jedoch die UV-induzierte (Fritz und Kaina, 1997 und 1999) (Abb.38, B., vgl. Spur 5 und 6) und auch die basale ERK1/2-Aktivität (nicht gezeigt).



**Abb.38: Inhibitoren der von Wachstumsfaktoren benutzten Signalwege hemmen nicht die Aktivierung der p38-MAPK durch TCDD.**

Logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden zum einen direkt für 5 h mit 1 nM TCDD- bzw. 0,1% DMSO-haltigem Medium inkubiert und zum anderen zuvor zusätzlich für (A) 45 min mit Suramin (300  $\mu$ M), einem Signalinhibitor von Wachstumsfaktor-rezeptoren, (B) 15 min mit Wortmannin (1  $\mu$ M), einem Inhibitor der PI-3-Kinase, und (C) 15 min mit PP1 (10  $\mu$ g/ml), einem Inhibitor der c-src-Kinase behandelt. Die Menge an phosphorylierter p38-MAPK wurde mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines für Phospho-p38-MAPK spezifischen Antikörpers bestimmt. Zur Sicherstellung gleichmäßig geladener Proteinmengen wurde die Membran mit einem nicht phosphospezifischen alle p38-MAPK-Isoformen erkennenden Antikörper rehybridisiert. Die Effektivität der Inhibitoren Suramin und Wortmannin wurde anhand der bekannten Hemmung der durch UVC (30J/m<sup>2</sup>) induzierten ERK1/2-Phosphorylierung überprüft ((A) bzw. (B), rechter Teil der Abbildungen). Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Suramin bzw. Wortmannin oder überhaupt nicht vorbehandelt, bestrahlt, und nach weiteren 30 min die Zellextrakte mittels Western-Blot (wie oben beschrieben) analysiert.

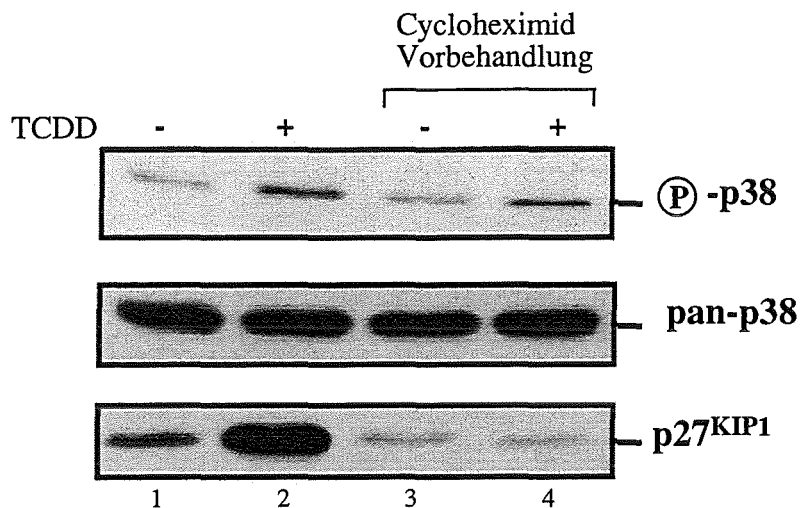
Die in 5L-Zellen erhöhte p38-MAPK-Aktivität in Gegenwart von Wortmannin (Abb.38, B., vgl. Spur 1 und 3), wurde auch für andere Inhibitoren des ERK1/2-Signalweges gefunden (wie z.B. dem MEK Inhibitor PD98059, (Daten nicht gezeigt)) und wurde für PD98059 ebenso in HeLa-Zellen (abgeleitet von einem menschlichen Zervixkarzinom) beschrieben. Diese offensichtliche Wechselwirkung zwischen den verschiedenen MAPKs ist mechanistisch noch nicht verstanden. Da TCDD die ERK1/2-Aktivität jedoch nicht hemmt, wurde dieser Aspekt nicht weiter als möglicher Mechanismus der TCDD-induzierten Aktivierung der p38-MAPK in Betracht gezogen.

Zuletzt wurde die Rolle der mit Wachstumsfaktoren assoziierten und durch TCDD aktivierbaren Kinase c-src (Enan und Matsumura, 1996) überprüft. Deren spezifischer Inhibitor PPI hat weder auf die basale noch auf die durch TCDD induzierte p38-MAPK Aktivität einen signifikanten Effekt. Außerdem aktiviert TCDD in 5L-Zellen wahrscheinlich nicht die c-src-Kinase (siehe auch 4.2.12), weshalb der c-src-Kinase in diesen Zellen wohl eher keine Rolle bei der Vermittlung von TCDD-Effekten zukommt.

Faßt man die beschriebenen Experimente zusammen, so interferiert weder die Hemmung der durch Wachstumsfaktoren benutzten Signalwege mit der p38-MAPK-Aktivierung durch TCDD noch kann im Überstand TCDD-behandelter 5L-Zellen eine die p38-MAPK induzierende sezernierte Aktivität nachgewiesen werden. Somit muß ein von Wachstumsfaktorsekretion und von Wachstumsfaktorrezeptoren unabhängiger Mechanismus der p38-MAPK-Aktivierung postuliert werden.

#### **4.3.7 Der AhR aktiviert die p38-MAPK unabhängig von neuer Proteinsynthese**

Wie kann der AhR unabhängig von Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren die p38-MAPK aktivieren? Geht man von der bisher bekannten Wirkungsweise des AhR als ligandenabhängigen Transkriptionsfaktor aus, könnte der AhR durch die Transaktivierung von Zielgenen und der dadurch erhöhten Expression der durch sie kodierten Proteine die p38-MAPK aktivieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die p38-MAPK-Aktivierung durch TCDD in Gegenwart des Translationshemmers Cycloheximid untersucht.



**Abb.39: Die Aktivierung der p38-MAPK durch TCDD ist unabhängig von neuer Proteinsynthese.** Logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden entweder direkt für 5 h mit 1 nM TCDD- bzw. 0,1% DMSO-haltigem Medium inkubiert oder zuvor zusätzlich für 15 min mit dem Translationshemmer Cycloheximid (20 µg/ml) behandelt. Die Menge an phosphorylierter p38-MAPK wurde mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines für Phospho-p38-MAPK spezifischen Antikörpers bestimmt. Zur Sicherstellung gleichmäßig geladener Proteinnengen wurde die Membran mit einem nicht phosphospezifischen, alle p38-MAPK-Isoformen erkennenden Antikörper rehybridisiert. Die Effektivität der Translationshemmung wurde durch gleichzeitige Bestimmung der p27<sup>KIP1</sup>-Proteinnengen überprüft.

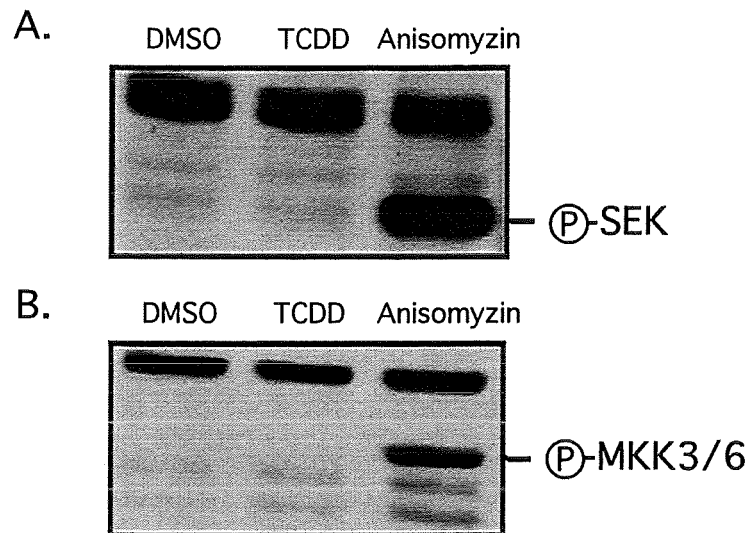
Cycloheximid-Gabe verhindert die p38-MAPK-Aktivierung durch TCDD nicht (Abb.39, oben). Die Cycloheximidbehandlung war in diesem Experiment effektiv, da die Induktion des p27<sup>KIP1</sup>-Proteins, trotz induzierter mRNA (Kolluri, Dissertation 1998), komplett verhindert wurde (Abb.39, unten). Somit aktiviert der AhR die p38-MAPK ohne daß intermediärer Proteine exprimiert werden müssen. Der AhR vermittelt die p38-MAPK-Aktivierung in 5L-Zellen wahrscheinlich durch Protein-Protein-Wechselwirkungen.

#### 4.3.8 Die bisher bekannten p38-MAPK-Kinasen MKK3/6 und SEK werden nicht durch TCDD aktiviert

Die Identifizierung des Punktes, an dem der AhR in die zur p38-MAPK führenden Signaltransduktionskaskaden eingreift, könnte wesentliche Hinweise auf den Mechanismus und mögliche Partnerproteine des AhR bei der p38-MAPK-Aktivierung liefern. Fast alle Aktivatoren der p38-MAPK erhöhen deren Phosphorylierung durch die Aktivierung der bisher bekannten MAPK-Kinasen MKK3/6 und SEK (siehe Einleitung).

Die Aktivierung der MKK3, MKK6 und SEK ist anhand der verstärkten Phosphorylierung mittels eines phosphospezifischen Antikörpers (siehe auch 4.3.4) bestimmbar. Der Translationshemmer Anisomyzin führt zu einer starken Aktivierung sowohl

der SEK als auch der beiden komigrierenden, und deshalb als eine Bande sichtbaren, MKK3 und MKK6 (Abb.40). Nach TCDD-Behandlung ist keine verstärkte Phosphorylierung weder der SEK (Abb.40, A.) noch der MKK3/6 (Abb.40, B.) zu beobachten .

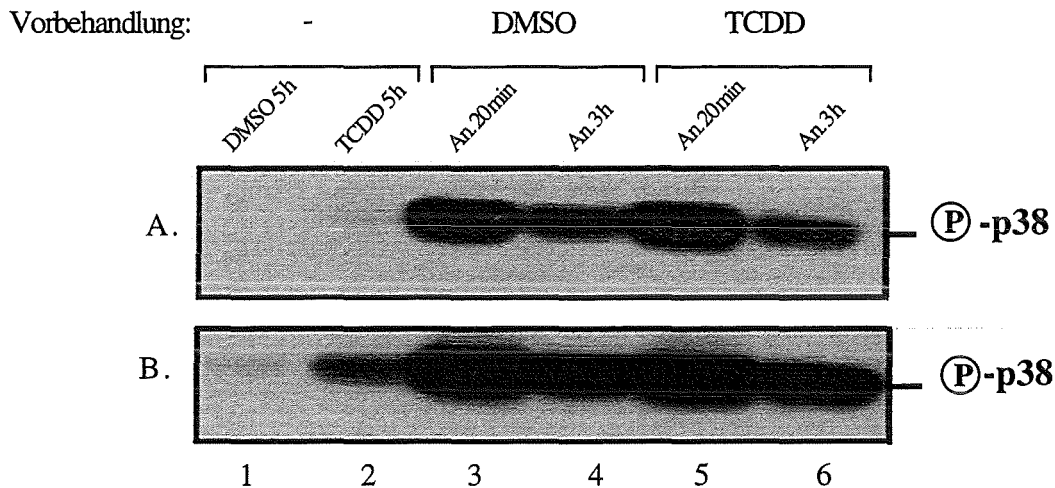


**Abb.40: Die bisher bekannten Kinasen für die p38-MAPK werden nicht durch TCDD aktiviert.** Logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden für 5 h mit 1 nM TCDD- bzw. 0,1% DMSO- oder für 20 min mit Anisomyzin-haltigem Medium (10 µg/ml) inkubiert. Die Menge an phosphorylierter SEK bzw. MKK3/6 wurde mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines für Phospho-SEK (A) bzw. Phospho-MKK3/6 (B) spezifischen Antikörpers bestimmt. Zur Sicherstellung gleichmäßig geladener Proteinmengen wurde ein Teil des Gels mit Coomassie-Blau gefärbt (nicht gezeigt).

#### 4.3.9 Die Dephosphorylierung der p38-MAPK wird nicht durch TCDD gehemmt

Da die bekannten Kinasen der p38-MAPK nicht aktiviert werden, erfolgt die AhR bedingte p38-MAPK Aktivierung also entweder durch eine neue, bisher unbekannte Kinase oder erklärt sich durch die Hemmung der p38-MAPK-Dephosphorylierung. Letzteres ist beispielsweise für den Tumorpromotor Arsenit in Bezug auf die JNKs und p38-MAPK beschrieben worden (Cavigelli *et al.*, 1996). Die beiden Sreßkinasen JNK und p38-MAPK werden zumeist transient induziert, d.h. es erfolgt zunächst ein steiler Anstieg der Phosphorylierung in den ersten 20 bis 40 Minuten (je nach Induktor), die jedoch nach 1-2 h wieder abnimmt. Die Abnahme der Phosphorylierung dieser Kinasen wird den für sie spezifischen Phosphatasen zugeschrieben. Wird zusätzlich zu einem transienten starken Induktor ein Phosphataseinhibitor wie Arsenit gegeben, verhindert dieser die Dephosphorylierung der JNK bzw. p38-MAPK und bewirkt so eine lang anhaltende, starke Aktivierung beider Kinasen.

In Analogie zu den mit Arsenit beschriebenen Experimenten wurde der Einfluß von TCDD auf die p38-MAPK-Dephosphorylierung untersucht. Dazu wurde Anisomyzin als starker transients Induktor der p38-MAPK-Phosphorylierung verwendet. Anisomyzin bewirkt zunächst einen starken Anstieg der Phosphorylierung (Abb.41, vgl. Spur 1 und 3) die nach 3 h wieder abnimmt (Abb.41, vgl. Spur 3 und 4). Kann TCDD die zwischen 20 min und 3 h nach Anisomyzingabe stattfindende Abnahme der p38-MAPK-Phosphorylierung hemmen?



**Abb.41: TCDD hemmt nicht die Dephosphorylierung der p38-MAPK.**

Logarithmisch wachsende 5L-Zellen wurden für 5 h in Gegenwart von 1 nM TCDD bzw. 0,1% DMSO kultiviert. Anisomyzingabe (An., 10 µg/ml) erfolgte über den angegebenen Zeitraum zusätzlich vor Ende der 5 h Inkubation mit entweder 0,1% DMSO bzw. 1 nM TCDD. Die Menge an phosphorylierter p38-MAPK wurde mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines für Phospho-p38-MAPK spezifischen Antikörpers bestimmt. Zur Sicherstellung gleichmäßig geladener Proteinmengen wurde ein Teil des Gels mit Coomassie-Blau gefärbt (nicht gezeigt). (A) kurze bzw. (B) lange Filmexposition zur Verdeutlichung der p38-MAPK-Dephosphorylierung (A) bzw. der p38-MAPK-Aktivierung durch TCDD (B).

5L-Zellen wurden für 2 h mit TCDD behandelt, um ausreichend Zeit für den AhR zur Interaktion mit potentiellen Partnerproteinen zu erlauben, die zur möglichen Hemmung der Dephosphorylierung der p38-MAPK beitragen.

Anschließend wurden die Zellen für weitere 20 min bzw. weitere 3 h mit Anisomyzin inkubiert. TCDD-Vorbehandlung verhindert weder die maximale p38-MAPK-Aktivierung nach 20 min Anisomyzin (Abb.41, vgl Spur 3 und 5) noch die Abnahme der p38-MAPK-Phosphorylierung 3 h nach Anisomyzingabe (Abb.41, vgl Spur 3 und 4 mit Spur 5 und 6). Somit hemmt TCDD nicht die Dephosphorylierung der p38-MAPK. TCDD führt auch nicht zur Aktivierung der bekannten p38-MAPK-Kinasen (siehe 4.3.8). Die Aktivierung der p38-MAPK durch den AhR wird deshalb wahrscheinlich durch eine neue, bisher unbekannte Kinase vermittelt.

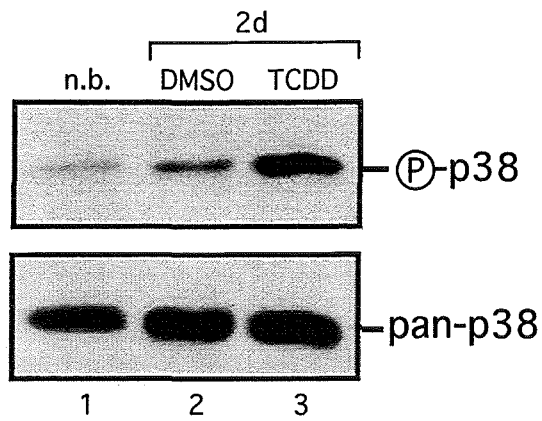
#### 4.3.10 TCDD aktiviert die p38-MAPK auch in primären Thymozyten aus der Maus

Außer der Leber ist der Thymus von Nagetieren ein wesentliches Zielorgan für Dioxintoxizität. TCDD-Behandlung führt zur Thymusatrophie, die sich zum einen in einer reduzierten Organgröße und zum anderen in einer verringerten Anzahl der den Thymus besiedelnden Thymozyten äußert.

Wenn die in 5L-Zellen gefundenen TCDD-Effekte ein Modell für Dioxintoxizität im Organismus sein sollen, dann muß der Versuch unternommen werden, diese Effekte in komplexeren, eher physiologischen Systemen nachzuweisen. Ein erfolgreich verwendetes System ist der in Organkultur kultivierte fötale Thymus (kurz FTOC für engl. *fetal thymus organ culture*), in dem die normal im Organismus ablaufende Thymozytendifferenzierung verfolgt werden kann. Kultiviert man den fötalen Thymus in Gegenwart von TCDD kann in den aus der FTOC isolierten primären Thymozyten eine Proliferationshemmung durch TCDD beobachtet werden, die im wesentlichen durch die Induktion von p27<sup>Kip1</sup> verursacht wird (M.Göttlicher, pers. Mitteilung). Somit sind die aus 5L-Zellen gewonnenen Ergebnisse tatsächlich auf ein eher physiologisches System übertragbar. Außerdem bewirkt TCDD in der FTOC eine Veränderung des Anteils verschiedenen Differenzierungsstadien während der Thymozytenreifung. Für den p38-MAPK Signalweg wurde ebenso eine zentrale Rolle bei der Thymozytendifferenzierung in der FTOC gezeigt (Sugawara *et al.*, 1998).

Ob TCDD in primären Mausthymozyten ebenso wie in 5L-Zellen die p38-MAPK aktiviert und somit neben der p27<sup>Kip1</sup>-Induktion einen weiteren für die Thymozytenreifung essentiellen Signalweg reguliert wurde anhand der Phosphorylierung der p38-MAPK überprüft. TCDD steigert die Phosphorylierung der p38-MAPK in primären Mausthymozyten (Abb.42, vgl. Spur 2 und 3), die aus der Organkultur fötaler Thymusdrüsen gewonnen wurden (zur Verfügung gestellt von M. Göttlicher). Die p38-MAPK, die auch für die normale Thymusentwicklung wichtig ist, könnte deshalb nach unangemessener Induktion zur Thymustoxizität von TCDD beitragen.





**Abb.42: Aktivierung der p38-MAPK in primären Maus-Thymozyten.**

14,5 Tage alten Mausembryonen wurde der Thymus entnommen und als komplettes Organ zunächst 1 Tag kultiviert und anschließend für weitere zwei Tage in 1 nM TCDD bzw. 0,1% DMSO oder ohne Behandlung kultiviert (FTOC). Anschließend wurden Thymozyten präpariert und ein Gesamtzellextrakt angefertigt. Die Menge an phosphorylierter p38-MAPK wurde mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines für Phospho-p38-MAPK spezifischen Antikörpers bestimmt. Zur Sicherstellung gleichmäßig geladener Proteinmengen wurde die Membran mit einem nicht phosphospezifischen alle p38-MAPK-Isoformen erkennenden Antikörper rehybridisiert.  
n.b.: nicht behandelt.

## 5 Diskussion

Der AhR vermittelt die Giftigkeit von Dioxinen (Fernandez-Salguero *et al.*, 1996) und spielt eine fundamentale Rolle während der postnatalen Leberentwicklung (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995; Schmidt und Bradfield, 1996; Lahvis und Bradfield, 1998). Die dafür erforderlichen AhR-abhängigen genetischen Programme sind bisher völlig ungeklärt. Für den AhR ist bisher kein endogener physiologischer Ligand bekannt und deshalb dient die Aktivierung des Rezeptors durch Dioxine als Sonde zum Auffinden sowohl der für Dioxintoxizität als auch der für die Physiologie des AhR wichtigen biologischen Programme.

Ebenso unbekannt ist, auf welche Weise der AhR diese Programme reguliert. Für die ligandenabhängigen Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Steroidhormonrezeptoren beispielsweise konnten mehrere Wirkungsweisen für ein und denselben Rezeptor beschrieben werden. So können nukleäre Rezeptoren nach Bindung an ihre DNA-Erkennungssequenzen die Expression von Genen induzieren. Andere Zielgene werden in ihrer Expression reprimiert, da der Rezeptor mit aktivierenden Transkriptionsfaktoren interferiert („transcription factor cross talk“), (Jonat *et al.*, 1990; Schüle und Evans, 1991; Göttlicher *et al.*, 1998). Eine weitere Wirkungsweise nukleärer Rezeptoren ist die Aktivierung oder Hemmung zytoplasmatischer Signaltransduktionskaskaden (Migliaccio *et al.*, 1996 und 1998; Caelles *et al.*, 1997; Peterziel, 1998). Die Etablierung geeigneter Modellsysteme zur Analyse der verschiedenen Dioxinwirkungen ist die Voraussetzung zur Aufklärung der Wirkungsweisen des AhR und der durch diesen Rezeptor regulierten Signalwege und genetischen Programme.

Durch Verwendung des Modellsystems der Dioxinwirkungen in 5L-Zellen war es möglich drei neue Wirkungen des AhR zu beschreiben: 1) die Induktion des Zellzyklusinhibitors p27<sup>Kip1</sup>, 2) die Aktivierung der p38-MAPK und 3) die Steigerung des mRNA-Gehalts der Proto-Onkogene *c-Jun* und *c-Fos*. Zunächst möchte ich die Mechanismen und Konsequenzen dieser Wirkungen in 5L-Zellen diskutieren. Anschließend sollen die beobachteten Effekte in 5L-Zellen hinsichtlich ihrer möglichen Bedeutung für die Giftigkeit von Dioxinen *in vivo* interpretiert werden. Im letzten Abschnitt sollen Überlegungen über einen möglichen funktionellen Zusammenhang der genannten Dioxinwirkungen mit der physiologischen Funktion des AhR angestellt werden.

## 5.1 Mechanismen und Konsequenzen der Dioxinwirkungen in 5L-Zellen

### 5.1.1 Induktion von p27<sup>Kip1</sup> und deren Konsequenzen in 5L-Zellen

#### 5.1.1.1 Wie induziert der AhR p27<sup>Kip1</sup> ?

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß der AhR die Transkription des *Kip1*-Gens erhöht und dessen Promotor aktiviert. Dies ist das erste Beispiel für die direkte Regulation von p27<sup>Kip1</sup> auf der Transkriptionsebene. In anderen experimentellen Systemen variiert die Menge an p27<sup>Kip1</sup>-Protein mit den verschiedenen Phasen des Zellzyklus (Übersicht in Hengst und Reed, 1998). So sollte in 5L-Zellen überprüft werden, ob die *Kip1*-Induktion lediglich die Folge eines Zellzyklusarrests nach TCDD-Behandlung ist. Diese Hypothese konnte ausgeschlossen werden, da die Induktion der *Kip1*-mRNA auch in serumgehungenerten, zellzyklusarretierten Zellen möglich ist (K. Kolluri, Dissertation 1998). Die Induktion der *Kip1*-mRNA ist am ehesten durch eine direkte Wirkung des AhR auf die *Kip1*-Expression erklärbar. Dafür spricht, daß TCDD auch in Gegenwart des Translationshemmers Cycloheximid die *Kip1*-mRNA (K. Kolluri, Dissertation 1998) induziert und außerdem die *de novo* Transkription (4.2.9) als auch den Promotor von *Kip1* (4.2.10) induziert.

Wie induziert der AhR *Kip1*? Die offensichtliche Annahme geht davon aus, daß *Kip1* wie andere klassische Zielgene des AhR (z.B. *Cyp1A1*) durch Bindung eines AhR/ARNT-Heterodimers an ein XRE im *Kip1*-Promotor induziert wird. Die Regulation des *Kip1*-Promotors wie auch die durch Dioxin verursachte Proliferationshemmung in 5L-Zellen wird jedoch wahrscheinlich nicht durch eine ARNT- bzw. XRE-abhängige Wirkung vermittelt.

Zum einen führt die Überexpression des AhR-Partnerproteins ARNT zu einer gesteigerten Aktivierung eines kotransfizierten XRE-abhängigen Reportergenplasmids, antagonisiert jedoch gleichzeitig die hemmende Dioxinwirkung auf den Zellzyklus. Zum anderen hatte die Überexpression eines mutierten ARNT-Proteins, das die Aktivierung des XRE abhängigen Reportergens drastisch hemmte, keine Wirkung auf die Proliferationshemmung durch Dioxin (Kolluri, Dissertation 1996).

Außerdem enthält der durch Dioxin aktivierbare zwischen den Positionen -1609 und -1312 gelegene Promotorbereich (im weiteren 16/13-Element genannt) des *Kip1*-Gens keine XRE-Zielsequenzen (siehe 4.2.10).

Wie vermittelt der AhR dann die Induktion des *Kip1*-Gens? Der AhR benötigt zur Hemmung der Rb-Phosphorylierung fortlaufende Transkription (siehe 4.2.2) und zur Induktion von p27<sup>Kip1</sup> eine intakte DNA-Bindungsdomäne (siehe 4.2.8). In einer in transienten Transfektionen durchgeführten Deletionsanalyse des AhR wurde ebenso die Notwendigkeit der DNA-Bindungs- wie auch der Transaktivierungsfunktion des Rezeptors

für die Proliferationshemmung gezeigt (Kolluri, Dissertation 1998). Somit aktiviert der AhR vermutlich die Transkription des *Kip1*-Gens durch direkte Bindung an dessen Promotor. Die bekannte XRE-Sequenz TNGCGTG setzt sich zusammen aus der AhR-Bindestelle TNGC sowie der ARNT-Bindestelle GTG. Das Motiv TNGC befindet sich mehrmals in dem 16/13-Element woran der AhR binden und entweder alleine oder durch die Interaktion mit einem bisher unbekanntem Partnerprotein die Induktion vermitteln könnte.

In der Tat gibt es Hinweise für neue Interaktionspartner des AhR. So konnte in Maushepatomzellen eine ligandenunabhängige Interaktion des AhR mit einem Mitglied aus der Familie der NF $\kappa$ -B Transkriptionsfaktoren, Rel A, gezeigt werden, deren funktionelle Bedeutung jedoch bisher unklar ist (Tian *et al.*, 1999). In 5L-Zellen konnte eine ligandenabhängige Interaktion des AhR mit dem hypophosphorylierten Rb-Protein nachgewiesen werden (Ge und Elferink, 1998).

Könnte der AhR durch die Interaktion mit Rb in 5L-Zellen *Kip1* induzieren? Um sämtliche Daten zur p27<sup>Kip1</sup>-Induktion durch TCDD mit einer AhR/Rb-Interaktion in Einklang zu bringen, müßte gefordert werden, daß der AhR direkt an den *Kip1*-Promotor bindet und dort mit Rb interagiert. Ob der AhR zusammen mit einem Partnerprotein oder alleine (evtl. auch als Homodimer) die *Kip1*-Transkription erhöht kann jedoch erst nach Bestimmung der AhR-responsiven Elemente im *Kip1*-Promotor untersucht werden.

### **5.1.1.2 Konsequenzen der *Kip1*-Induktion in 5L-Zellen**

Die erhöhte *Kip1*-Expression in 5L-Zellen führt zu einer Hemmung der Zyklin E/CDK2- und wahrscheinlich auch der Zyklin D/CDK4 bzw. CDK6-Aktivität und verhindert dadurch die Phosphorylierung des Rb-Proteins. Die Induktion von *Kip1* und die Verzögerung der Proliferation bewirken eine Entkopplung von Proliferation und Proteingehalt bzw. Größe der Zelle. TCDD-Behandlung von 5L-Zellen führt zu einem erhöhten Proteingehalt pro Zelle und zu einer erhöhten Zellgröße (Göttlicher und Wiebel, 1991). Daß *Kip1* tatsächlich eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Zellgröße zukommt, konnte in *Kip1*-defizienten Mäusen beobachtet werden. Verlust von *Kip1*-Expression führt zu einer verringerten Zellgröße in der Leber und im Hirn diese Tiere (Fero *et al.*, 1996).

Erhöhte *Kip1*-Expression und verzögerte Proliferation korrelieren oft mit einer verstärkten Zelldifferenzierung (Casaccia-Bonofil *et al.*, 1997; Harvat *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998). Für 5L-Zellen trifft dies jedoch nicht zu, da sie nach TCDD-Behandlung keine für differenzierte Leberzellen charakteristischen Gene exprimieren (Moore und Weiss, 1982; Göttlicher und Wiebel 1991).

TCDD-behandelte 5L-Zellen proliferieren weiterhin - trotz *Kip1*-Induktion. Die G1-S-Progression nach TCDD-Gabe ist stark verzögert und verlängert die Verdopplungszeit auf 75 h (Göttlicher und Wiebel, 1991). Die Frage wie 5L-Zellen die inhibitorische Aktivität von *Kip1* überwinden läßt sich ausweiten auf die grundsätzliche Frage wie Zellen die Länge der G1-S-Progression kontrollieren? Ist die Dauer der Zyklin/CDK-Aktivität entscheidend, um einen kritischen Schwellenwert von phosphorylierten zellulären Substraten, wie beispielsweise pRB, zu erzeugen oder ist es das Erreichen einer kritischen Zellgröße, welche die Komplettierung der G1-S-Phase bestimmen (Polymenis und Schmidt, 1999). 5L-Zellen könnten ein geeignetes System darstellen, um dieser grundsätzlichen Frage nachzugehen.

### 5.1.2 Wie reguliert der AhR die Aktivität der p38-MAPK?

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal die Aktivierung der p38-MAPK durch den AhR gezeigt werden. Der Mechanismus der p38-MAPK-Aktivierung durch Dioxin weicht völlig von den bisher beschriebenen Mechanismen der p38-MAPK-Aktivierung ab. Erstens führt Dioxin im Gegensatz zu den bisher bekannten Induktoren der p38-MAPK zu einer persistenten und ausschließlichen Aktivierung der p38-MAPK. Zweitens kann nach Dioxingabe weder eine für die meisten Induktoren beschriebene Aktivierung der bekannten p38-MAPK-Kinasen noch eine für die Tumorpromotoren Arsenit und Okadaic-Acid beschriebene Hemmung der Dephosphorylierung der p38-MAPK beobachtet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es wahrscheinlich, daß Dioxin die Aktivierung einer noch unbekanntem p38-MAPK-Kinase bewirkt.

Überraschenderweise war zur Aktivierung der p38-MAPK durch Dioxin keine Neusynthese von Proteinen notwendig. Somit aktiviert der AhR durch eine bisher unbekannte nicht genomische Wirkung die p38-MAPK. Auch andere nukleäre Rezeptoren aus der Familie der Steroidhormonrezeptoren können über einen nicht genomischen Wirkungsmechanismus zytoplasmatische Signaltransduktionskaskaden beeinflussen. Der Östrogen-, Progesteron- und auch der Androgenrezeptor aktivieren die MAP-Kinasen ERK1/2 (Migliaccio *et al.*, 1996 und 1998; Peterziel, Dissertation 1998). Eine hemmende Wirkung auf die MAP-Kinase JNK wurde für den Glukokortikoidrezeptor beschrieben (Caelles *et al.*, 1997). Für alle Rezeptoren wurden Protein/Protein-Wechselwirkungen mit noch unbekanntem Partnerproteinen postuliert, durch die der zur ERK1/2 bzw. JNK führende Signalweg aktiviert bzw. gehemmt wird. Der ebenso zur Familie der nukleären Rezeptoren gehörende AhR aktiviert jedoch nicht die ERK1/2 noch hemmt er die JNK. Die durch den AhR bewirkte Aktivierung der p38-MAPK ist deshalb ein neuer Wirkungsmechanismus nukleärer Rezeptoren, der vermutlich auf Protein-Protein-Wechselwirkungen des AhR mit noch zu identifizierenden Partnerproteinen beruht.

Durch die Suche nach einer neuen, durch Dioxin aktivierbaren p38-MAPK-Kinase sowie deren im Signalweg „darüberliegenden“ Kinasen kann die durch den AhR induzierte Kinasekaskade zur p38-MAPK analysiert werden. Außerdem sollte es möglich sein durch die Ermittlung neuer Interaktionspartner des AhR in 5L-Zellen den Beginn der zur p38-MAPK Aktivierung führenden Signaltransduktionskaskade zu bestimmen.

## **5.2 Bedeutung der in 5L-Zellen beobachteten Effekte für die Dioxintoxizität *in vivo***

Der AhR vermittelt die Giftigkeit von Dioxinen, die sich vor allem in der veränderten Differenzierung bzw. Proliferation der Zellen des betroffenen Organs äußert (Übersicht in Schmidt und Bradfield, 1996; Göttlicher *et al.*, 1997a). Sinnvolle Modelle für Dioxintoxizität sind deshalb Zellen, die zum einen durch Dioxin in ihrer Proliferation- bzw. Differenzierung gestört sind und in denen zum anderen die beobachteten Effekte AhR-abhängig sind. Aus zwei Gründen sind die in dieser Arbeit verwendeten 5L-Rattenhepatomzellen als Modell besonders geeignet. Erstens hemmt Dioxin in diesen Zellen die Proliferation im Vergleich zu anderen Zellen besonders deutlich. Zweitens kann die AhR-Abhängigkeit der in den 5L Wildtypzellen durch Dioxin bewirkten Effekte durch deren Untersuchung sowohl in den AhR defizienten BP8<sup>Ahr-</sup> als auch in den in ihrer AhR-Expression rekonstituierten BP8<sup>Ahr+</sup>-Zellen gezeigt werden.

Daß der AhR nicht nur durch einen einzigen Wirkungsmechanismus die Effekte von Dioxinen vermittelt, war aufgrund des Vergleichs mit den Wirkungsweisen anderer nukleärer Rezeptoren zu erwarten (siehe auch Einleitung). So konnten in der vorliegenden Arbeit allein in 5L-Zellen schon drei verschiedene neue Wirkungen des AhR beschrieben werden, deren Verbindung zueinander aber auch vor allem zur Dioxintoxizität im weiteren diskutiert werden soll.

## 5.2.1 p27<sup>Kip1</sup>-Induktion und Dioxintoxizität

Die Giftigkeit von Dioxinen läßt sich hauptsächlich als Veränderung der Proliferation- bzw. Differenzierung von Zellen interpretieren. In welchem Zusammenhang steht p27<sup>Kip1</sup> mit der Proliferation bzw. Differenzierung von Zellen? In verschiedenen Zellkultursystemen wird die Menge an p27<sup>Kip1</sup> durch die unterschiedlichsten antimitogenen Signale wie auch während der Zelldifferenzierung erhöht (Übersicht in Hengst und Reed, 1998). Außerdem kann durch p27<sup>Kip1</sup>-Überexpression die Differenzierung einer Neuroblastomzelllinie der Maus (Kranenburg *et al.*, 1995) wie auch der menschlichen hämatopoetischen Zelllinie U937 (Liu *et al.*, 1996) initiiert werden. *Kip1*-defiziente Mäuse zeichnen sich im Vergleich zu normalen Mäusen durch ein vergrößertes Körpergewicht und einer Vergrößerung der unterschiedlichsten Organe wie z. B. der Leber und des Thymus aus und haben einen Defekt in der Differenzierung der Oligodendrozyten (Fero *et al.*, 1996; Kiyokawa *et al.*, 1996; Nakayama *et al.*, 1996; Cassacia-Bonnefil *et al.*, 1997).

Kann die in 5L-Zellen beobachtete p27<sup>Kip1</sup>-Induktion mit der im Gesamtorganismus beschriebenen Dioxintoxizität in verschiedenen Organen korreliert werden?

Eine der wesentlichen Vergiftungserscheinungen im Nagetier nach Dioxinbehandlung ist die Thymusatrophie. Dabei führt Dioxin zur Verkleinerung des gesamten Thymusorgans und zur Reduktion der Anzahl der den Thymus besiedelten Thymozyten (Silverstone *et al.*, 1994; Staples *et al.*, 1998). Die im Versuchstier beobachtbaren TCDD-Effekte im Thymus lassen sich in der Thymusorgankultur (kurz FTOC; engl. *fetal thymus organ culture*) reproduzieren (Kremer *et al.*, 1994; Lai *et al.*, 1997). In der FTOC hemmt TCDD die Proliferation der Thymozyten und führt zur Induktion von p27<sup>Kip1</sup> (M. Göttlicher, pers. Mitteilung). Ob die p27<sup>Kip1</sup>-Induktion nach TCDD-Behandlung die Voraussetzung für die Proliferationshemmung der Thymozyten ist, läßt sich mit Hilfe von Mäusen mit funktionell inaktiviertem *Kip1* untersuchen. In Mäusen, in denen das *Kip1*-Allel durch gezielte Rekombination mutiert wurde ist der N-terminale Bereich des p27<sup>Kip1</sup>-Proteins deletiert ( $\Delta 51$  Allel). Das so mutierte p27<sup>Kip1</sup>-Protein kann nicht mehr mit Zyklin/CDK-Komplexen interagieren und somit auch nicht deren katalytische Aktivität hemmen (Kiyokawa *et al.*, 1996). In der FTOC etabliert aus Mäusen mit funktionell inaktiviertem *Kip1* hemmt TCDD die Thymozytenproliferation nur noch marginal (M. Göttlicher, pers. Mitteilung). Somit konnte das durch Experimente mit 5L-Zellen gewonnene Ergebnis der kausalen Rolle von p27<sup>Kip1</sup> bei der Vermittlung der TCDD-induzierten Proliferationshemmung auch auf die eher der physiologischen Situation entsprechende FTOC übertragen werden. Dies bestätigt die Brauchbarkeit des „artificialen“ Zellkultursystems zur Identifizierung von Wirkmechanismen, die auch in komplexen Organen gelten.

Um den Beitrag der p27<sup>Kip1</sup>-Induktion bei der Vermittlung weiterer Vergiftungserscheinungen nach TCDD-Behandlung zu überprüfen, müssen Mäuse mit TCDD behandelt werden und die Menge an p27<sup>Kip1</sup> in den einzelnen Organen untersucht werden. Durch den Vergleich mit den aus ähnlichen Experimenten in *Kip1*-defizienten Mäusen erhaltenen Ergebnissen kann dann die kausale Rolle von *Kip1* in der Vermittlung einzelner toxischer TCDD-Effekte überprüft werden.

### 5.2.2 Therapeutische Nutzung der p27<sup>Kip1</sup>-Induktion durch den AhR

Die Kanzerogenität von Dioxinen im Nager (Kociba *et al.*, 1978; Pitot *et al.*, 1980) und Menschen (Übersicht in Huff *et al.*, 1994) lassen sich schlecht durch die Induktion eines Zellzyklus-Inhibitors erklären. *Kip1* scheint eher ein Tumorsuppressor-Gen, da in *Kip1*-defizienten Mäusen spontan Hypophysentumore entstehen (Fero *et al.*, 1996; Kiyokawa *et al.*, 1996; Nakayama *et al.*, 1996). Nach Mutagenexposition weisen *Kip1*-defiziente Mäuse eine erhöhte Tumorsuszeptibilität in mehreren unterschiedlichen Geweben auf, die sogar schon in *Kip1*-heterozygoten Mäusen nachweisbar ist (Fero *et al.*, 1996). Außerdem lassen sich reduzierte p27<sup>Kip1</sup>-Proteinmengen mit einer schlechteren Prognose menschlicher Tumore korrelieren (Catzavelos *et al.*, 1997; Fredersdorf *et al.*, 1997; Porter *et al.*, 1997; Steeg und Abrams, 1997). Die Tumor-Suppressor-Aktivität von *Kip1* könnte eine Erklärung bieten für die antikanzerogene Wirkung von TCDD hinsichtlich der Entstehung von Brustkrebs im Nager (Kociba *et al.*, 1978; Holcomb und Safe, 1994). So wäre es sogar denkbar die Induktion von *Kip1* durch bestimmte Liganden des AhR als Teil einer Zytostatika-Behandlung zur Krebsbekämpfung zu nutzen. Hierzu ist es notwendig die verschiedenen AhR-Aktivitäten, wie z.B. die Tumor-fördernde Wirkung des AhR von der zur *Kip1*-Induktion notwendigen Aktivität zu entkoppeln. Daß man die unterschiedlichen Aktivitäten eines ligandenabhängigen Transkriptionsfaktors dissoziieren kann, konnte beispielsweise für den Glukokortikoidrezeptor (GR) gezeigt werden. Durch die Wahl verschiedener Liganden können die unterschiedlichen Aktivitäten des GR entkoppelt werden (Heck *et al.*, 1997; Vayssière *et al.*, 1997).

### 5.2.3 p38-MAPK und Dioxintoxizität

Bevor ich die für Dioxine beschriebenen mit der für die p38-MAPK beschriebenen Wirkungen vergleiche und diese in Bezug auf die Dioxintoxizität eingehender diskutiere, soll zunächst die Beteiligung der P38-MAPK an der in dieser Arbeit beschriebenen Induktion von *Kip1* bzw. *c-Jun* und *c-Fos* durch TCDD diskutiert werden.



Welche Anhaltspunkte gibt es für die Beteiligung der p38-MAPK bei der Induktion von *Kip1* durch TCDD? Sowohl die Induktion von *Kip1* als auch der p38-MAPK-Aktivität durch TCDD sind unabhängig von laufender Proteinsynthese (siehe 4.3.7 und K. Kolluri, Dissertation 1998). So könnte der AhR durch Aktivierung der p38-MAPK auf den *Kip1*-Promotor wirken, ohne möglicherweise selbst an DNA zu binden. Gegen diese Hypothese spricht allerdings, daß der AhR eine intakte DNA-Bindungsdomäne sowohl zur Induktion von p27<sup>Kip1</sup> (siehe 4.2.8) wie auch zur Hemmung der Proliferation (Kolluri, Dissertation 1998) benötigt. Die Analyse des in der DNA-Bindungsdomäne (DBD) punktmutierten AhR A39R ergab jedoch auch, daß nicht nur die Induktion der *Kip1*-Expression (siehe 4.2.8) sondern auch die Steigerung der p38-MAPK-Aktivität (Daten nicht gezeigt) durch TCDD eine intakte DBD des AhR voraussetzt. Der Aminosäureaustausch in der DBD des AhR verhindert also nicht nur die DNA-Bindung des Rezeptors sondern auch die vermutlich durch Protein-Protein-Wechselwirkung vermittelte Aktivierung der p38-MAPK durch den AhR. Deshalb bleibt die Frage unbeantwortet, ob der AhR direkt durch die Bindung an den Promotor oder indirekt durch die Aktivierung der p38-MAPK *Kip1* induziert. Daß zusätzlich zu einer intakten DBD auch eine intakte Transaktivierungsdomäne (TAD) des AhR zur Proliferationshemmung notwendig ist (Kolluri, Dissertation 1998), spricht wieder für die „klassische“ Transaktivierung von *Kip1* durch den AhR. Möglicherweise ist die TAD des AhR jedoch ebenso für die Aktivierung der p38-MAPK essentiell.

Ob die p38-MAPK wirklich an der *Kip1*-Induktion durch den AhR beteiligt ist, könnte durch gezielte Hemmung der p38-MAPK und anschließender Analyse der *Kip1*-Mengen in unbehandelten bzw. TCDD-behandelten Zellen beantwortet werden. Die Hemmung der p38-MAPK-Aktivität kann zum einen durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren erreicht werden, die jedoch in 5L-Zellen möglicherweise aufgrund eines verstärkten Metabolismus nicht effizient waren (Daten nicht gezeigt). Zum anderen könnte durch die Überexpression einer katalytisch inaktiven Form der p38-MAPK in 5L-Zellen die Aktivität der endogenen p38-MAPK gehemmt werden. In der FTOC, in der TCDD ebenso *Kip1* und die p38-MAPK-Aktivität induziert, ist die Effizienz eines Inhibitors der p38-MAPK beschrieben (Sugawara *et al.*, 1998). So könnte in diesem System unter Verwendung des p38-MAPK-Inhibitors die Rolle der p38-MAPK in der *Kip1*-Induktion durch TCDD getestet werden.

Ist die p38-MAPK an der AhR-abhängigen Induktion der Proto-Onkogene *c-Fos* und *c-Jun* in 5L-Zellen (siehe 4.3.2) beteiligt?

Dafür spricht zum einen die Beobachtung, daß ein bekanntes Ziel der p38-MAPK, das *c-Fos*<sub>-711/+45</sub>-Promotorkonstrukt, das kein XRE enthält (Hoffer *et al.*, 1996), in 5L-Zellen durch TCDD induzierbar ist (siehe 4.3.3). Zum anderen aktiviert TCDD ebenso die an der *c-Fos*-Induktion durch die p38-MAPK beteiligten Transkriptionsfaktoren CREB und ELK-1 (siehe 4.3.5).

Die p38-MAPK vermittelt auch die Aktivierung des *c-Jun*-Promotors beispielsweise durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF-2 (van Dam *et al.*, 1995). TCDD führt ebenso zur Aktivierung sowohl des *c-Jun*-Promotors als auch des Transkriptionsfaktors ATF-2 (siehe 4.3.3 und 4.3.5).

Die Funktion der p38-MAPK in der Induktion von *c-Jun* und *c-Fos* durch TCDD kann letztendlich wie oben für Kip1 beschrieben durch die Hemmung der p38-MAPK-Aktivität und anschließender Untersuchung der *c-Jun*- bzw. *c-Fos*- mRNA-Mengen in unbehandelten und TCDD-behandelten Zellen überprüft werden.

Viele der durch Dioxin verursachten zellulären Reaktionen sind vergleichbar mit den durch die p38-MAPK vermittelten Effekten. Beispielsweise wirkt die p38-MAPK ebenso wie Dioxine fördernd auf die Differenzierung und hemmend auf die Proliferation (Molnar *et al.*, 1997) von Zellen. Auch bei der induzierten Expression von IL1 $\beta$  und TNF $\alpha$  (Lee *et al.*, 1994), zwei auch durch Dioxin regulierte Wachstumsfaktoren (Denison *et al.*, 1998), ist die Aktivität der p38-MAPK essentiell. Deshalb kann die Hypothese aufgestellt werden, daß der AhR einige toxische Dioxinwirkungen über die Induktion der p38-MAPK vermittelt. Exemplarisch soll diese Annahme für die Bedeutung der p38-MAPK und von Dioxinen auf die Zellen und Funktionen des Immunsystems diskutiert werden.

Dioxine führen zur Atrophie des Thymus (Fine *et al.*, 1990; Silverstone *et al.*, 1994; Staples *et al.*, 1998), bewirken degenerative Veränderungen des Knochenmarks (Silverstone *et al.*, 1994; Frazier *et al.*, 1994) und beeinflussen sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort (Silkworth *et al.*; 1986; Fine *et al.*; 1990). In der FTOC hemmt TCDD die Thymozytenproliferation hauptsächlich durch die Induktion von p27<sup>Kip1</sup> (wie oben diskutiert). TCDD-Gabe verringert zwar die Anzahl der Thymozyten, verhindert jedoch nicht die eigentliche Thymozytendifferenzierung (M.Göttlicher, pers. Mitteilung). Die in ihrer Differenzierung weiter fortgeschrittenen CD4- oder CD8- und T-Zell-Rezeptor- (TCR) positiven Zellen (Zuniga-Pflücker und Leonardo, 1996) scheinen nach sieben Tagen in der FTOC in Gegenwart von TCDD sogar angereichert im Vergleich zu den weniger gut differenzierten Stadien (M.Göttlicher, pers. Mitteilung).

Welche Bedeutung hat die p38-MAPK im Thymus bzw. während der T-Zellreifung? Während der Thymozytenentwicklung ist eine verstärkte Aktivierung der p38-MAPK zu beobachten (Sen *et al.*, 1996), deren Funktion allerdings unklar ist. In der FTOC konnte durch Überexpression der p38-MAPK-Kinase MKK6 auch eine wie oben für TCDD beschriebene Verschiebung im Verhältnis der einzelnen, unterschiedlich weit differenzierten Subpopulationen beobachtet werden (Sugawara *et al.*, 1998) und eine zentrale Rolle der p38-MAPK bei der negativen Selektion von Thymozyten gezeigt werden (Sugawara *et al.*, 1998). Außerdem scheint die p38-MAPK-Aktivität für die Aktivierung von Th1-Zellen essentiell zu sein (Rincón *et al.*, 1998). Nach der Aktivierung von CD4-positiven, naiven T-Zellen

differenzieren diese in Th1- bzw. Th2-Zellen, wobei ersteren vor allem bei der zellulären und letzteren bei der humoralen Immunantwort eine zentrale Rolle zukommt (Paul und Seder, 1994).

Ob TCDD nach 7 Tagen durch die Aktivierung der p38-MAPK zur Verschiebung des Verhältnis der einzelnen, unterschiedlich weit differenzierten Subpopulationen in der FTOC führt, kann durch die Verwendung der in der FTOC effektiv wirkenden (Rincón *et al.*, 1998) Inhibitoren der p38-MAPK überprüft werden. In ähnlichen Experimenten könnte auch die Rolle der p38-MAPK bei der Vermittlung von TCDD-Effekten auf Th1- bzw. Th2-Zellen untersucht werden.

#### **5.2.4 Die Regulation von AP-1 durch den AhR: mögliche Bedeutung für die Giftigkeit von Dioxinen**

Eine der wesentlichen giftigen Eigenschaften von Dioxinen ist ihre kanzerogene Wirkung (siehe auch Einleitung), wobei die dafür verantwortlichen Gene bisher unbekannt sind. In dieser Arbeit konnte erstmals die AhR-abhängige Regulation der Proto-Onkogene *c-Jun* und *c-Fos* gezeigt werden (Puga *et al.*, 1992; Hoffer *et al.*, 1996). Erhöhte Mengen an *c-Jun* und *c-Fos* wurden auch in der Leber TCDD-behandelter Ratten festgestellt (Fox *et al.*, 1993). Die dauerhafte, unphysiologische Aktivität von zellulären Proto-Onkogenen (bzw. Proto-Onkogenprodukten) macht aus diesen Onkogene (bzw. Onkogenprodukte).

Onkogene, auch Krebsgene genannt, zeichnen sich durch die folgenden drei wesentlichen Merkmale aus (Übersicht in Glick und Yuspa, 1994): 1) ihre Aktivität ist in Tumorzellen gegenüber normalen Zellen erhöht ; 2) ihre dauerhaft erhöhte Aktivität transformiert eine normale Zelle zur Tumorzelle und 3) ihre erhöhte Aktivität führt im Tiemodell (beispielsweise transgenen Mäusen) zu erhöhten Tumorraten. *c-Fos* erfüllt alle drei Anforderungen, während *c-Jun* eher die Wirkung anderer Onkogene zusätzlich steigert (Übersicht in Glick und Yuspa, 1994).

Die in dieser Arbeit gezeigte induzierte Expression bzw. Aktivierung von *c-Fos*, *c-Jun* oder auch ATF-2 nach Dioxinbehandlung bietet eine mögliche Erklärung für die kanzerogenen TCDD-Wirkungen. Eine interessante Korrelation besteht in Bezug auf die Lokalisation von AP-1- bzw. TCDD- induzierten Tumoren. Die ektopische Überexpression von *c-Jun* zusammen mit *c-Fos* in transgenen Mäusen führt hauptsächlich zu Bindegewebstumoren (Übersicht in Müller, 1994). Hohe Dioxinexposition erhöht beim Menschen ebenfalls die Tumorraten im Bindegewebe (siehe auch Einleitung). Um unabhängig von korrelativen Evidenzen die Funktion verschiedener AhR-Zielgene bei der Tumorpromotion durch Dioxine zu analysieren, wären mit TCDD durchgeführte

Tumorpromotionsstudien in entsprechenden „knock-out“ (k.o.)-Mäusen wie z.B. den *c-Fos*-k.o.-Mäusen denkbar.

Die genaue molekulare Wirkungsweise von Onkogenen ist immer noch unzureichend geklärt. Für *c-Fos* ist beispielsweise bekannt, daß es die genomische Instabilität, ein typisches Merkmal von Tumorzellen, fördert (van den Berg *et al.*, 1991 und 1993). Um Zellen komplett zu transformieren muß *c-Fos* über mehrere Stunden wirken (Miao und Curran, 1994), weshalb die Akkumulation von durch *c-Fos* regulierten Genprodukten postuliert wurde. Kürzlich konnte eine durch *c-Fos* induzierte Methyltransferase identifiziert werden, die eine entscheidende Rolle bei der durch *c-Fos*-Überexpression erzielten Zelltransformation spielen soll (Bakin und Curran, 1999). In der Maus ist *c-Fos* essentiell für die Tumorprogression induzierter Hauttumoren (Saez *et al.*, 1995). *c-Fos* kooperiert als Onkogen mit *c-Jun* und bildet mit diesem den Transkriptionsfaktor AP-1 (siehe Einleitung). Die Kombination der unterschiedlichen Mitglieder der AP-1-Familie generiert viele unterschiedliche AP-1 Transkriptionsfaktoren (siehe Einleitung), die möglicherweise völlig unterschiedliche Wirkungen in der Tumorprogression besitzen. Durch die Entwicklung von *c-Jun*-Mutanten, die entweder präferentiell mit ATF-2 oder mit *c-Fos* dimerisieren, konnten erstmals unterschiedliche, zur Zelltransformation notwendige Funktionen verschiedenen AP-1 Faktoren zugeordnet werden. So vermittelt ein Dimer aus *c-Fos* und *c-Jun* von einer Matrix unabhängiges Wachstum, während ein Dimer aus ATF-2 und *c-Jun* serumunabhängige Proliferation erlaubt (van Dam *et al.*, 1998).

Eine weitere wesentliche Eigenschaft von Dioxinen ist neben der kanzerogenen Wirkung die Förderung der Zelldifferenzierung. Ebenso wie bei der Tumorprogression kommt *c-Jun*, das in dieser Arbeit als neues Zielgen des AhR identifiziert wurde, eine wesentliche Bedeutung bei der Differenzierung von Zellen zu. Für *c-Jun* wird eine kausale Rolle bei der Differenzierung in Muskel bzw. Nervenzellen diskutiert (Vogt, 1994). Außerdem korreliert die Differenzierung beispielsweise der humanen Zelllinien HL-60 und U937 mit erhöhter *c-Jun*-Expression (Vogt, 1994). Ob *c-Jun* als Vermittler der TCDD-induzierten Differenzierung in unterschiedlichen Zellen in Frage kommt, könnte durch Inaktivierung von *c-Jun* in den entsprechenden Zellen und anschließender Analyse der verbleibenden TCDD-Effekte beantwortet werden.

### 5.3 Physiologische Bedeutung des AhR

Die Funktion des AhR in der Vermittlung der Toxizität von Fremdstoffen (Xenobiotika) ist Gegenstand der Forschung der letzten 20 Jahre. Hierbei konnte der AhR als ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor identifiziert werden, der nach Aktivierung durch Fremdstoffe Zielgene reguliert, die zur Entgiftung dieser Fremdstoffe beitragen können.

Da der AhR eine zentrale Rolle im Fremdstoffmetabolismus spielt, wurde der Rezeptor als zumeist als „Sensor“ für giftige Substanzen angesehen. Da Fremdstoffe vor allem durch die Nahrung aufgenommen werden, könnte der „biologische Sinn“ des AhR in seiner ernährungsphysiologischen Bedeutung liegen. Tatsächlich sind zahlreiche Pflanzeninhaltsstoffe wie auch die während der Fleischzubereitung anfallenden heterozyklischen Amine als Aktivatoren des AhR beschrieben (Übersicht in Denison *et al.*, 1999). Die Relevanz dieses durch die tägliche Nahrungsaufnahme aktivierten AhR für die Gesundheit des Menschen ist bisher völlig unklar.

Durch die in den letzten Jahren entstandene Möglichkeit der gezielten Inaktivierung eines Gens („knock-out“) kann dessen physiologische Notwendigkeit in der Maus studiert werden.

Der AhR-„knock-out“ wurde unabhängig voneinander von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995; Schmidt und Bradfield, 1996). In beiden „knock-outs“ ist die Lebergröße stark reduziert und eine portale Hyperzellularität sowie eine Fibrose zu beobachten (Übersicht in Schmidt und Bradfield, 1996). Der AhR hat also neben seiner Bedeutung im Fremdstoffmetabolismus auch eine entscheidende Funktion in der Entwicklung bzw. Homöostase der Leber.

Die durch den AhR vermittelten Dioxineffekte können eventuell auch Aufschlüsse über die physiologische AhR-Funktion während der Leberentwicklung geben. Welche Zielgene des AhR könnten für die Leberentwicklung wichtig sein? Für die in dieser Arbeit beschriebenen Zielgene des AhR *c-Jun* und *Kip1* ist eine Verbindung zur Leberentwicklung beschrieben.

Der „knock-out“ von *c-Jun* ist embryonal lethal und ist vor allem durch eine gestörte Leberentwicklung und Erythropoese gekennzeichnet. Die wesentliche Funktion von *c-Jun* in der Leberentwicklung wird zusätzlich durch die Experimente mit chimären Mäusen gestützt, in denen *c-Jun*<sup>-/-</sup>-Zellen zur Bildung aller Gewebe außer der Leber beitragen (Hilberg *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1993). Ob *c-Jun* auch in der postnatalen Leberentwicklung essentiell ist, und somit möglicherweise eine ausbleibende *c-Jun*-Expression die verzögerte Leberentwicklung in den AhR knock-out Mäusen erklärt, ist bisher jedoch unbekannt.

In *Kip1*-„knock-out“-Mäusen ist die gesamte Leber vergrößert (Fero *et al.*, 1996; Kiyokawa *et al.*, 1996; Nakayama *et al.*, 1996), während in den AhR-„knock-out“-Mäusen die Gesamtgröße der Leber reduziert ist. Jedoch ist in AhR-„knock-out“-Mäusen in der portalen Leber eine Hyperzellularität zu beobachten (siehe oben). Es wäre denkbar, daß der AhR in dieser Leberregion durch Kontrolle der *Kip1*-Expression die Anzahl der portalen Leberzellen reguliert. Der letztendliche Beweis, daß der AhR durch die Expressionskontrolle von *Kip1* die Entwicklung der portalen Leber beeinflusst, wäre experimentell sehr schwierig. Ein möglicher Ansatz setzt die Kenntnis des für den AhR essentiellen Regulationselements im *Kip1*-Promotor voraus. Dieses Element könnte entweder in Mäusen deletiert oder eventuell durch Punktmutation funktionell inaktiviert werden und anschließend der Phänotyp in der portalen Leber analysiert werden.

Da für den AhR kein endogener physiologischer Ligand bekannt ist, dient die Aktivierung des Rezeptors durch Dioxine als Sonde zum Auffinden der durch den AhR regulierten physiologischen Programme. Die nach Dioxinaktivierung des AhR regulierten Signalwege und genetischen Programme geben Hinweise auf die physiologischen Funktionen des Rezeptors, wie beispielweise bei der Leberhomöostase oder der Reaktion auf auch in der Nahrung enthaltene Fremdstoffe.

## 6 Literatur

American Chemical Society (1995). EPA's Dioxin Reassessment. *Environmental Science & Technology*, **29**: 26A-28A

Angel, P., Allegretto, E. A., Okino, S. T., Hattori, K., Boyle, W. J., Hunter, T. und Karin, M. (1988). Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature*, **332**: 166-171.

Angel, P. und Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*, **1072**: 129-57.

Bakin, A.V. und Curran, T. (1999). Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos. *Science*, **283**: 387-390.

Bartek, J., Bartkova, J. und Lukas, J. (1996). The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol*, **8**: 805-14.

Blagosklonny, M.V. (1997). Loss of function and p53 protein stabilization. *Oncogene*, **15**: 1889-1893.

Blain, S.W., Montalvo, E. und Massague, J. (1997). Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4. *J Biol Chem*, **272**: 25863-25872.

Blankenship, A. und Matsumura, F. (1997). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced activation of a protein tyrosine kinase, pp60src, in murine hepatic cytosol using a cell-free system. *Mol Pharmacol*, **52**: 667-675.

Blattner, C., Knebel, A., Radler-Pohl, A., Sachsenmaier, C., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H.J. (1994). DNA damaging agents and growth factors induce changes in the program of expressed gene products through common routes. *Environ Mol Mutagen*, **24**: 3-10.

Burbach, K. M., Poland, A. und Bradfield, C. A. (1992). Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**: 8185-9.

Caelles, C., Gonzalez-Sancho, J. M. und Munoz, A. (1997). Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev*, **11**: 3351-64.

Casaccia-Bonnel, P., Tikoo, R., Kiyokawa, H., Friedrich, V., Jr., Chao, M.V. und Koff, A. (1997). Oligodendrocyte precursor differentiation is perturbed in the absence of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *Genes Dev*, **11**: 2335-2346.

Catzavelos, C., Bhattacharya, N., Ung, Y.C., Wilson, J.A., Roncari, L., Sandhu, C., Shaw, P., Yeger, H., Morava-Protzner, I., Kapusta, L., Franssen, E., Pritchard, K.I. und Slingerland, J.M. (1997). Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med*, **3**: 227-230.

Cavigelli, M., Li, W.W., Lin, A., Su, B., Yoshioka, K. und Karin, M. (1996). The tumor-promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *EMBO J.*, **15**: 6269-6279.

Couture, L., Abbott, B. und Birnbaum, L. (1990). A critical review of the developmental toxicity and teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: recent advances toward understanding the mechanism. *Teratology*, **42**: 619-627.

Curran, T. und Teich, N. M. (1982). Candidate product of the FBJ murine osteosarcoma virus oncogene: characterization of a 55,000-Dalton phosphoprotein. *J Virol*, **42**: 114-122.

- Deng, T. und Karin, M. (1993). JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes Dev*, **7**: 479-490.
- Denison, M., Fisher, J. und Whitlock, J. J. (1989). Protein-DNA Interaction at Recognition Sites for the Dioxin-Ah Receptor Complex. *J Biol Chem*, **264**: 16478-16482.
- Denison, M.S., Phelan, D. und Elferink, C.J. The Ah Receptor Signal Transduction Pathway. Denison, M.S. und Helferich, W. (1998). *Toxicant-receptor interactions : modulation of signal transduction and gene expression*. Taylor & Francis, Washington, DC: 3-33.
- Denison, M.S., Seidel, S.D., Rogers, W.J., Ziccardi, M., Winter, G.M. und Health-Pagliuso, S. Natural and Synthetic Ligands for the Ah Receptor. Puga, A. und Wallace, K.B. (1999). *Molecular biology of the toxic response*. Taylor & Francis, Philadelphia, PA: 393-410.
- Dolwick, K. M., Swanson, H. I. und Bradfield, C. A. (1993). In vitro analysis of Ah receptor domains involved in ligand-activated DNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**: 8566-70.
- Dong, L., Ma, Q. und Whitlock, J. P., Jr. (1996). DNA binding by the heterodimeric Ah receptor. Relationship to dioxin-induced CYP1A1 transcription in vivo. *J Biol Chem*, **271**: 7942-8.
- el-Deiry, W.S. (1998). p21/p53, cellular growth control and genomic integrity. *Curr Top Microbiol Immunol*, **227**: 121-137.
- Ema, M., Sogawa, K., Watanabe, N., Chujoh, Y., Matsushita, N., Gotoh, O., Funae, Y. und Fujii-Kuriyama, Y. (1992). cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochem Biophys Res Commun.*, **184**: 246-253.
- Enan, E. und Matsumura, F. (1995). Evidence for a second pathway in the action mechanism of 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Significance of Ah-receptor mediated activation of protein kinase under cell-free conditions. *Biochem Pharmacol*, **49**: 249-61.
- 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.
- Fernandez, P. und Safe, S. (1992). Growth inhibitory and antimutagenic activity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in T47D human breast cancer cells. *Toxicol Lett*, **61**: 185-197.
- Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D.M., McPhail, T., Lee, S.S., Kimura, S., Nebert, D.W., Rudikoff, S., Ward, J.M. und Gonzalez, F.J. (1995) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science*, **268**, 722-726.
- Fernandez-Salguero, P. M., Hilbert, D. M., Rudikoff, S., Ward, J. M. und Gonzalez, F. J. (1996). Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, **140**: 173-9.
- Fero, M.L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C.E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L.H., Broudy, V., Perlmutter, R.M., Kaushansky, K. und Roberts, J.M. (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell*, **85**: 733-744.
- Fine, J.S., Silverstone, A.E. und Gasiewicz, T.A. (1990). Impairment of prothymocyte activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p- dioxin. *J Immunol*, **144**: 1169-1176.



- Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., El Saboutry, S., Dani, C., Jeanteur, P. und Blanchard, J. (1985). Various rat adult tissues express only one major m-RNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.*, **13**: 1431-1442.
- Fox, T., Best, L., Goldsworthy, S., Mills, J. und Goldsworthy, T. (1993). Gene expression and cell proliferation in rat liver after 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure. *Cancer Res.*, **53**: 2265-2271.
- Frazier, D.E., Jr., Silverstone, A.E., Soultz, J.A. und Gasiewicz, T.A. (1994). The thymus does not mediate 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin- elicited alterations in bone marrow lymphocyte stem cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, **124**: 242-247.
- Fredersdorf, S., Burns, J., Milne, A.M., Packham, G., Fallis, L., Gillett, C.E., Royds, J.A., Peston, D., Hall, P.A., Hanby, A.M., Barnes, D.M., Shousha, S., O'Hare, M.J. und Lu, X. (1997). High level expression of p27(kip1) and cyclin D1 in some human breast cancer cells: inverse correlation between the expression of p27(kip1) and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**: 6380-6385.
- Fritz, G. und Kaina, B. (1997). rhoB encoding a UV-inducible Ras-related small GTP-binding protein is regulated by GTPases of the Rho family and independent of JNK, ERK, and p38 MAP kinase. *J Biol Chem*, **272**: 30637-44.
- Fritz, G. und Kaina, B. (1999). Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 by UV irradiation is inhibited by wortmannin without affecting c-jun expression. *Mol Cell Biol*, **19**: 1768-74.
- Fujisawa-Sehara, A., Sogawa, K., Yamane, M. und Fujii-Kuriyama, Y. (1987). Characterization of xenobiotic responsive elements upstream from the drug-metabolizing cytochrome P-450c gene: a similarity to glucocorticoid regulatory elements. *Nucleic Acids Res*, **15**: 4179-91.
- Gaido, K. W., Maness, S. C., Leonard, L. S. und Greenlee, W. F. (1992). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-dependent regulation of transforming growth factors-alpha and -beta 2 expression in a human keratinocyte cell line involves both transcriptional and post-transcriptional control. *J Biol Chem*, **267**: 24591-5.
- Ge, N.L. und Elferink, C.J. (1998). A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin signaling to the cell cycle. *J Biol Chem*, **273**: 22708-22713.
- Glick, A. und Yuspa, S.H. (1994). Participation of Fos and Jun in Multistage Carcinogenesis. Angel, P. und Herrlich, P. (eds.). *The Fos and Jun families of transcription factors*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA: 275-293.
- Göttlicher, M., Cikryt, P. und Wiebel, F. J. (1990). Inhibition of growth by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in 5L rat hepatoma cells is associated with the presence of Ah receptor. *Carcinogenesis*, **11**: 2205-10.
- Göttlicher, M. und Wiebel, F. J. (1991). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes unbalanced growth in 5L rat hepatoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, **111**: 496-503.
- Göttlicher, M., Kolluri, K. und Weiß, C. (1997a). Die molekulare Basis der Wirkungen des Umweltgiftes Dioxin. *FZK-Nachrichten* 29, **3**: 211-220.
- Göttlicher, M., Rahmsdorf, H.J. und Herrlich, P. The AP-1 Family of Transcription Factors: Multi-Level Control of Activity. Papavassiliou, A. (1997b). *Transcription factors in eukaryotes*. Chapman & Hall Landes Bioscience, New York Austin: 67-93.

- Göttlicher, M., Heck, S. und Herrlich, P. (1998). Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med*, **76**: 480-9.
- Hankinson, O. (1983). Dominant and recessive aryl hydrocarbon hydroxylase-deficient mutants of mouse hepatoma line, Hepa-1, and assignment of recessive mutants to three complementation groups. *Somatic Cell Genet*, **9**: 497-514.
- Hapgood, J., Cuthill, S., Denis, M., Poellinger, L. und Gustafsson, J.-A. (1989). Specific protein-DNA interaction at a xenobiotic-responsive element: Copurification of dioxin receptor and DNA-binding activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**: 60-64.
- Harper, J. W. und Elledge, S. J. (1996). Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev*, **6**: 56-64.
- Harvat, B.L., Wang, A., Seth, P. und Jetten, A.M. (1998). Up-regulation of p27Kip1, p21WAF1/Cip1 and p16Ink4a is associated with, but not sufficient for, induction of squamous differentiation. *J Cell Sci*, **111**: 1185-1196.
- Heck, S., Bender, K., Kullmann, M., Gottlicher, M., Herrlich, P. und Cato, A.C.B. (1997). IκBa-independent downregulation of NF-κB activity by glucocorticoid receptor. *EMBO J.*, **16**: 4698-4707.
- Hengst, L., Gopfert, U., Lashuel, H. A. und Reed, S. I. (1998). Complete inhibition of Cdk/cyclin by one molecule of p21(Cip1). *Genes Dev*, **12**: 3882-8.
- Hengst, L. und Reed, S. I. (1998). Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr Top Microbiol Immunol*, **227**: 25-41.
- Herr, I., van Dam, H. und Angel, P. (1994). Binding of promoter-associated AP-1 is not altered during induction and subsequent repression of the c-jun promoter by TPA and UV irradiation. *Carcinogenesis*, **15**: 1105-13.
- Herrlich, P., Blattner, C., Knebel, A., Bender, K. und Rahmsdorf, H.J. (1997). Nuclear and non-nuclear targets of genotoxic agents in the induction of gene expression. Shared principles in yeast, rodents, man and plants. *Biol Chem*, **378**: 1217-1229.
- Hilberg, F., Aguzzi, A., Howells, N. und Wagner, E.F. (1993). c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature*, **365**, 179-181.
- Hoffer, A., Chang, C.Y. und 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. C., Reyes, H., Chu, F. F., Sander, F., Conley, L. H., Brooks, B. A. und Hankinson, O. (1991). Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science*, **252**: 954-8.
- Holcomb, M. und Safe, S. (1994). Inhibition of 7,12-dimethylbenzanthracene-induced rat mammary tumor growth by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Lett*, **82**: 43-47.
- Huang, T.S., Duyster, J. und Wang, J.Y. (1995). Biological response to phorbol ester determined by alternative G1 pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**: 4793-4797.
- Hudson, L. G., Toscano, W. A., Jr. und Greenlee, W. F. (1985). Regulation of epidermal growth factor binding in a human keratinocyte cell line by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol*, **77**: 251-9.
- Huff, J., Lucier, G. und Tritscher, A. (1994). Carcinogenicity of TCDD: experimental, mechanistic, and epidemiologic evidence. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **34**: 343-72.

- Hunt, A.E., Lali, F.V., Lord, J.D., Nelson, B.H., Miyazaki, T., Tracey, K.J. und Foxwell, B.M. (1999). Role of interleukin (IL)-2 receptor beta-chain subdomains and shc in p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase and p54 MAP kinase (Stress- activated protein Kinase/c-Jun N-terminal kinase) activation. Il-2- driven proliferation is independent of p38 and p54 map kinase activation. *J Biol Chem*, **274**: 7591-7597.
- Jain, S., Dolwick, K. M., Schmidt, J. V. und Bradfield, C. A. (1994). Potent transactivation domains of the Ah receptor and the Ah receptor nuclear translocator map to their carboxyl termini. *J Biol Chem*, **269**: 31518-24.
- Johnson, R.S., van Lingen, B., Papaioannou, V.E. und Spiegelman, B.M. (1993). A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes Dev*, **7**, 1309-1317.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K. K., Cato, A. C., Gebel, S., Ponta, H. und Herrlich, P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell*, **62**: 1189-2104.
- Karenlampi, S., Legraverend, C., Gudas, J., Carramanzana, N. und Hankinson, O. (1988). A Third Genetic Locus Affecting the Ah (Dioxin) Receptor. *J Biol Chem*, **263**: 10111-10117.
- Kato, J. Y., Matsuoka, M., Polyak, K., Massague, J. und Sherr, C. J. (1994). Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27<sup>Kip1</sup>) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell*, **79**: 487-96.
- Kiyokawa, H., Kineman, R.D., Manova-Todorova, K.O., Soares, V.C., Hoffman, E.S., Ono, M., Khanam, D., Hayday, A.C., Frohman, L.A. und Koff, A. (1996). Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell*, **85**: 721-732.
- Knebel, A., Rahmsdorf, H. J., Ullrich, A. und Herrlich, P. (1996). Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.*, **15**: 5314-25.
- Kociba, R. J., Keyes, D. G., Beyer, J. E., Carreon, R. M., Wade, C. E., Dittenber, D. A., Kalnins, R. P., Frauson, L. E., Park, C. N., Barnard, S. D., Hummel, R. A. und Humiston, C. G. (1978). Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, **46**: 279-303.
- Kolluri, S.K. (1998). Search for Ah (Dioxin) receptor target genes which mediate dioxin toxicity: Induction of p27<sup>Kip1</sup> cell cycle inhibitor and N-myristoyltransferase 2. *Dissertation am Institut für Genetik (Forschungszentrum Karlsruhe)*.
- Kortenjann, M., Thomae, O. und Shaw, P. E. (1994). Inhibition of v-raf-dependent c-fos expression and transformation by a kinase-defective mutant of the mitogen-activated protein kinase Erk2. *Mol Cell Biol*, **14**: 4815-24.
- Krämer, M., Sachsenmaier, C., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H.J. (1993). UV irradiation-induced interleukin-1 and basic fibroblast growth factor synthesis and release mediate part of the UV response. *J Biol Chem*, **268**: 6734-6741.
- Kranenburg, O., Scharnhorst, V., Van der Eb, A.J. und Zantema, A. (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinase activity triggers neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells. *J Cell Biol*, **131**: 227-234.
- Kremer, J., Gleichmann, E. und Esser, C. (1994). Thymic stroma exposed to arylhydrocarbon receptor-binding xenobiotics fails to support proliferation of early thymocytes but induces differentiation. *J Immunol*, **153**: 2778-2786.

- Kwon, T. K., Nagel, J. E., Buchholz, M. A. und Nordin, A. A. (1996). Characterization of the murine cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27Kip1. *Gene*, **180**: 113-20.
- LaBaer, J., Garrett, M. D., Stevenson, L. F., Slingerland, J. M., Sandhu, C., Chou, H. S., Fattaey, A. und Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* **11**: 847-62.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lai, Z.W., Hundeiker, C., Gleichmann, E. und Esser, C. (1997) Cytokine gene expression during ontogeny in murine thymus on activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Mol Pharmacol*, **52**, 30-37.
- Lahvis, G.P. und Bradfield, C.A. (1998). Ahr null alleles: distinctive or different? *Biochem Pharmacol*, **56**, 781-787.
- Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W. und et al. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, **372**, 739-746.
- Lees, E. (1995). Cyclin dependent kinase regulation. *Curr Opin Cell Biol* **7**: 773-80.
- Legraverend, C., Hannah, R., Eisen, H., Owens, I., Nebert, D. und Hankinson, O. (1982). Regulatory Gene Product of the Ah Locus. *J Biol Chem* **257**: 6402-6407.
- Levkau, B., Koyama, H., Raines, E. W., Clurman, B. E., Herren, B., Orth, K., Roberts, J. M. und Ross, R. (1998). Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell* **1**: 553-63.
- Li, H., Dong, L. und Whitlock, J. J. (1994). Transcriptional activation function of the mouse Ah receptor nuclear translocator. *J Biol Chem*. **269**: 28098-28105.
- Lin, F. H., Clark, G., Birnbaum, L. S., Lucier, G. W. und Goldstein, J. A. (1991). Influence of the Ah locus on the effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin on the hepatic epidermal growth factor receptor. *Mol Pharmacol* **39**: 307-13.
- Liu, M., Lee, M.H., Cohen, M., Bommakanti, M. und Freedman, L.P. (1996) Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev*, **10**, 142-153.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randell, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Madhukar, B. V., Brewster, D. W. und Matsumura, F. (1984). Effects of in vivo-administered 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on receptor binding of epidermal growth factor in the hepatic plasma membrane of rat, guinea pig, mouse, and hamster. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 7407-11.
- Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**: 179-85.
- Matsushime, H., Quelle, D. E., Shurtleff, S. A., Shibuya, M., Sherr, C. J. und Kato, J. Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **14**: 2066-76.
- Matthews, J. C., Hori, K. und Cormier, M. J. (1977). Purification and properties of Renilla reniformis luciferase. *Biochemistry* **16**: 85-91.

- Mayo, M.W., Wang, C.Y., Cogswell, P.C., Rogers-Graham, K.S., Lowe, S.W., Der, C.J. und Baldwin, A.S., Jr. (1997). Requirement of NF-kappaB activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. *Science*, **278**: 1812-1815.
- Mechta, F., Lallemand, D., Pfarr, C. M. und Yaniv, M. (1997). Transformation by ras modifies AP1 composition and activity. *Oncogene* **14**: 837-47.
- Miao, G.G. und Curran, T. (1994). Cell transformation by c-fos requires an extended period of expression and is independent of the cell cycle. *Mol Cell Biol*, **14**: 4295-4310.
- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E. und Auricchio, F. (1996). Tyrosine kinase/p21<sup>ras</sup>/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.* **15**: 1292-1300.
- Migliaccio, A., Piccolo, D., Castoria, G., Di Domenico, M., Bilancio, A., Lombardi, M., Gong, W., Beato, M. und Auricchio, F. (1998). Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J.* **17**: 2008-18.
- Minden, A. und Karin, M. (1997). Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim Biophys Acta*, **1333**: F85-104.
- Molnar, A., Theodoras, A.M., Zon, L.I. und Kyriakis, J.M. (1997). Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK. *J Biol Chem*, **272**: 13229-13235.
- Moore, E. E. und Weiss, M. C. (1982). Selective isolation of stable and unstable dedifferentiated variants from a rat hepatoma cell line. *J Cell Physiol* **111**: 1-8.
- Müller, R. (1994). Role of Fos Proteins in the Induction of Transformation and DNA Synthesis. Angel, P. und Herrlich, P. (eds.). *The Fos and Jun families of transcription factors*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA: 193-219.
- Münzel, P., Bock-Hennig, B., Schieback, S., Gschaidmeier, H., Beck-Gschaidmeier, S. und Bock, K.W. (1996). Growth modulation of hepatocytes and rat liver epithelial cells (WB-F344) by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Carcinogenesis*, **17**, 197-202.
- Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., Loh, D.Y. und Nakayama, K. (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*, **85**: 707-720.
- Nambu, J., Lewis, J., Wharton, K. J. und 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.
- Nebert, D. W., Eisen, H. J., Negishi, M., Lang, M. A., Hjelmeland, L. M. und Okey, A. B. (1981). Genetic mechanisms controlling the induction of polysubstrate monooxygenase (P-450) activities. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **21**: 431-62.
- Nebert, D. W., Puga, A. und Vasiliou, V. (1993). Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann N Y Acad Sci* **685**: 624-40.
- Nebert, D. W. (1994). Drug-metabolizing enzymes in ligand-modulated transcription. *Biochem Pharmacol* **47**: 25-37.
- Nordeen, S. K. (1988). Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques* **6**: 454-8.

- Ohtsubo, M., Theodoras, A.M., Schumacher, J., Roberts, J.M. und Pagano, M. (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol*, **15**: 2612-2624.
- Okey, A. B., Riddick, D. S. und Harper, P. A. (1994). Molecular biology of the aromatic hydrocarbon (dioxin) receptor. *Trends Pharmacol Sci* **15**: 226-32.
- Olson, M.F., Paterson, H.F. und Marshall, C.J. (1998). Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature*, **394**: 295-299.
- Pardee, A. B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**: 603-8.
- Paul, W.E. und Seder, R.A. (1994) Lymphocyte response and cytokines. *Cell*, **76**, 241-251
- Peeper, D.S., Upton, T.M., Ladha, M.H., Neuman, E., Zalvide, J., Bernards, R., DeCaprio, J.A. und Ewen, M.E. (1997). Ras signalling linked to the cell-cycle machinery by the retinoblastoma protein [published erratum appears in *Nature* 1997 Apr 3;386(6624):521]. *Nature*, **386**: 177-181.
- Perdew, G. und Poland, A. (1988). Purification of the Ah receptor from C57BL/6J mouse liver. *J Biol Chem*. **263**: 9848-9852.
- Peterson, R. E., Theobald, H. M. und Kimmel, G. L. (1993). Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: cross-species comparisons. *Crit Rev Toxicol* **23**: 283-335.
- Peterziel, H. (1998). Signaltransduktion durch den Androgenrezeptor: genomische und nicht-genomische Wirkungen von Androgenen und Antiandrogenen. *Dissertation am Institut für Genetik (Forschungszentrum Karlsruhe)*.
- Pfarr, C. M., Mehta, F., Spyrou, G., Lallemand, D., Carillo, S. und Yaniv, M. (1994). Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. *Cell* **76**: 747-60.
- Pitot, H.C., Goldsworthy, T., Campbell, H.A. und Poland, A. (1980). Quantitative evaluation of the promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosamine. *Cancer Res*, **40**: 3616-3620.
- Poellinger, L., Göttlicher, M. und Gustafsson, J. A. (1992). The dioxin and peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear receptors in search of endogenous ligands. *Trends Pharmacol Sci* **13**: 241-5.
- Poland, A. und Knutson, J. C. (1982). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **22**: 517-54.
- Poland, A., Glover, E. und Bradfield, C. (1991). Characterization of polyclonal antibodies to the Ah receptor prepared by immunization with a synthetic peptide haptan. *Mol Pharmacol*. **39**: 20-26.
- Pollenz, R., Sattler, C. und 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.
- Polymenis, M. und Schmidt, E.V. (1999). Coordination of cell growth with cell division. *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 76-80.
- Porter, P.L., Malone, K.E., Heagerty, P.J., Alexander, G.M., Gatti, L.A., Firpo, E.J., Daling, J.R. und Roberts, J.M. (1997). Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin

- E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat Med*, **3**: 222-225.
- Puga, A., Nebert, D.W. und Carrier, F. (1992). Dioxin induces expression of c-fos and c-jun proto-oncogenes and a large increase in transcription factor AP-1. *DNA Cell Biol*, **11**: 269-281.
- Ramakrishna, G. und Anderson, L.M. (1998). Levels and membrane localization of the c-K-ras p21 protein in lungs of mice of different genetic strains and effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and Aroclor 1254. *Carcinogenesis*, **19**: 463-470.
- Reisz-Porszasz, S., Probst, M. R., Fukunaga, B. N. und Hankinson, O. (1994). Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT). *Mol Cell Biol* **14**: 6075-86.
- Rausch, O. und Marshall, C.J. (1999). Cooperation of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen- activated protein kinase pathways during granulocyte colony-stimulating factor-induced hemopoietic cell proliferation. *J Biol Chem*, **274**: 4096-4105.
- Reyes, H., Reisz-Porszasz, S. und 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.
- Rincon, M., Enslin, H., Raingeaud, J., Recht, M., Zapton, T., Su, M.S., Penix, L.A., Davis, R.J. und Flavell, R.A. (1998). Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *Embo J*, **17**, 2817-2829.
- Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Zinck, R., Nordheim, A., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H. J. (1994). Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell* **78**: 963-72.
- Saez, E., Rutberg, S.E., Mueller, E., Oppenheim, H., Smoluk, J., Yuspa, S.H. und Spiegelman, B.M. (1995). c-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell*, **82**, 721-732.
- Schmidt, J. V. und Bradfield, C. A. (1996). Ah receptor signaling pathways. *Ann Rev Cell Dev Biol* **12**: 55-89.
- Schönthal, A. und Feramisco, J.R. (1993). Inhibition of histone H1 kinase expression, retinoblastoma protein phosphorylation, and cell proliferation by the phosphatase inhibitor okadaic acid. *Oncogene*, **8**: 433-441.
- Schorpp, M., Mallick, U., Rahmsdorf, H.J. und Herrlich, P. (1984). UV-induced extracellular factor from human fibroblasts communicates the UV response to nonirradiated cells. *Cell*, **37**: 861-868.
- Schüle, R. und Evans, R. (1991). Cross-coupling of signal transduction pathways: zinc finger meets leucine zipper. *Trends. Genet.* **7**: 377-381.
- Sen, J., Kapeller, R., Fragoso, R., Sen, R., Zon, L.I. und Burakoff, S.J. (1996). Intrathymic signals are mediated by p38-mitogen activated protein kinase. *J. Immunol.*, **156**, 4535-4538
- Sherr, C. J. und Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **9**: 1149-63.
- Silkworth, J.B., Antrim, L.A. und Sack, G. (1986). Ah receptor mediated suppression of the antibody response in mice is primarily dependent on the Ah phenotype of lymphoid tissue. *Toxicol Appl Pharmacol*, **86**: 380-390.

- Silverstone, A.E., Frazier, D.E., Jr., Fiore, N.C., Soultz, J.A. und Gasiewicz, T.A. (1994). Dexamethasone, beta-estradiol, and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin elicit thymic atrophy through different cellular targets. *Toxicol Appl Pharmacol*, **126**: 248-259.
- Staples, J.E., Murante, F.G., Fiore, N.C., Gasiewicz, T.A. und Silverstone, A.E. (1998). Thymic alterations induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are strictly dependent on aryl hydrocarbon receptor activation in hemopoietic cells. *J Immunol*, **160**: 3844-3854.
- Steeg, P.S. und Abrams, J.S. (1997). Cancer prognostics: past, present and p27. *Nat Med*, **3**: 152-154.
- Steiner, P., Philipp, A., Lukas, J., Godden-Kent, D., Pagano, M., Mittnacht, S., Bartek, J. und Eilers, M. (1995). Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes. *EMBO J.*, **14**: 4814-4826.
- Sugawara, T., Moriguchi, T., Nishida, E. und Takahama, Y. (1998). Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes. *Immunity*, **9**: 565-574.
- Suskind, R.R. (1985). Chloracne, "the hallmark of dioxin intoxication". *Scand J Work Environ Health*, **11**: 165-171.
- Sutter, T. R., Guzman, K., Dold, K. M. und Greenlee, W. F. (1991). Targets for dioxin: genes for plasminogen activator inhibitor-2 and interleukin-1 beta. *Science* **254**: 415-8.
- Swanson, H. I. und Bradfield, C. A. (1993). The AH-receptor: genetics, structure and function. *Pharmacogenetics* **3**: 213-30.
- Swanson, H. I., Chan, W. K. und Bradfield, C. A. (1995). DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J Biol Chem* **270**: 26292-302.
- Takahashi, J. S. (1992). Circadian clock genes are ticking. *Science* **258**: 238-40.
- Tian, Y., Ke, S., Denison, M.S., Rabson, A.B. und Gallo, M.A. (1999). Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J Biol Chem*, **274**, 510-515.
- Tullis, K., Olsen, H., Bombick, D.W., Matsumura, F. und Jankun, J. (1992). TCDD causes stimulation of c-ras expression in the hepatic plasma membranes in vivo and in vitro. *J Biochem Toxicol*, **7**: 107-116.
- Turteltaub, K. W., Felton, J. S., Gledhill, B. L., Vogel, J. S., Southon, J. R., Caffee, M. W., Finkel, R. C., Nelson, D. E., Proctor, I. D. und Davis, J. C. (1990). Accelerator mass spectrometry in biomedical dosimetry: relationship between low-level exposure and covalent binding of heterocyclic amine carcinogens to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 5288-92.
- van Dam, H., Duyndam, M., Rottier, R., Bosch, A., de Vries-Smits, L., Herrlich, P., Zantema, A., Angel, P. und van der Eb, A. J. (1993). Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO J.* **12**: 479-87.
- van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P. und Angel, P. (1995). ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J.* **14**: 1798-811.
- van Dam, H., Huguier, S., Kooistra, K., Baguet, J., Vial, E., van der Eb, A.J., Herrlich, P., Angel, P. und Castellazzi, M. (1998) Autocrine growth and anchorage independence: two complementing Jun- controlled genetic programs of cellular transformation. *Genes Dev*, **12**, 1227-1239.



- van den Berg, S., Kaina, B., Rahmsdorf, H.J., Ponta, H. und Herrlich, P. (1991). Involvement of fos in spontaneous and ultraviolet light-induced genetic changes. *Mol Carcinog*, **4**: 460-466.
- van den Berg, S., Rahmsdorf, H.J., Herrlich, P. und Kaina, B. (1993). Overexpression of c-fos increases recombination frequency in human osteosarcoma cells. *Carcinogenesis*, **14**: 925-928.
- van den Heuvel, J., Clark, G., Kohn, M., Tritscher, A., Greenlee, W., Lucier, G. und Bell, D. (1994). Dioxin-responsive Genes: Examination of Dose-Response Relationships Using Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Cancer Res.*, **54**, 62-68.
- Vaziri, C. und Faller, D.V. (1997). A benzo[a]pyrene-induced cell cycle checkpoint resulting in p53- independent G1 arrest in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*, **272**: 2762-2769.
- Vayssiere, B.M., Dupont, S., Choquart, A., Petit, F., Garcia, T., Marchandeu, C., Gronemeyer, H. und Resche-Rigon, M. (1997). Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity in vivo. *Mol Endocrinol*, **11**: 1245-1255.
- Vogel, C. und Abel, J. (1995). Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on growth factor expression in the human breast cancer cell line MCF-7. *Arch Toxicol*, **69**: 259-265.
- Vogelstein, B. und Kinzler, K.W. (1992). p53 function and dysfunction. *Cell*, **70**: 523-526.
- Vogelstein, B. und Kinzler, K.W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet*, **9**: 138-141.
- Vogt, P.K. (1994). Oncogenic Transformation by Jun. Angel, P. und Herrlich, P. (eds.). *The Fos and Jun families of transcription factors*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA: 203-219.
- Wang, W., Smith, R., 3rd und Safe, S. (1998). Aryl hydrocarbon receptor-mediated antiestrogenicity in MCF-7 cells: modulation of hormone-induced cell cycle enzymes. *Arch Biochem Biophys*, **356**: 239-248.
- Wang, H., Xie, Z. und Scott, R. E. (1996). Differentiation modulates the balance of positive and negative Jun/AP-1 DNA binding activities to regulate cellular proliferative potential: different effects in nontransformed and transformed cells. *J Cell Biol* **135**: 1151-62.
- Watson, A.J. und Hankinson, O. (1992). Dioxin- and Ah receptor-dependent protein binding to xenobiotic responsive elements and G-rich DNA studied by in vivo footprinting. *J Biol Chem*, **267**: 6874-6878.
- Watson, A. J., Weir-Brown, K. I., Bannister, R. M., Chu, F. F., Reisz-Porszasz, S., Fujii-Kuriyama, Y., Sogawa, K. und Hankinson, O. (1992). Mechanism of action of a repressor of dioxin-dependent induction of Cyp1a1 gene transcription. *Mol Cell Biol* **12**: 2115-23.
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**: 323-30.
- Weiß, C. (1995). Rekonstitution der Dioxinwirkungen in AhR-defizienten Hepatomzellen. *Diplomarbeit am Institut für Genetik (Forschungszentrum Karlsruhe)*.
- Weiß, C., Kolluri, S. K., Kiefer, F. und Göttlicher, M. (1996). Complementation of Ah receptor deficiency in hepatoma cells: negative feedback regulation and cell cycle control by the Ah receptor. *Exp Cell Res* **226**: 154-63.

Whitelaw, M., Göttlicher, M., Gustafsson, J. und 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. L., Gustafsson, J. A. und 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**: 8343-55.

Whitmarsh, A.J. und Davis, R.J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med*, **74**: 589-607.

Whitmarsh, A.J. und Davis, R.J. (1998). Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci*, **23**: 481-485.

Wiebel, F. J., Klose, U. und Kiefer, F. (1991). Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in vitro: H4IIEC3- derived 5L hepatoma cells as a model system. *Toxicol Lett* **55**: 161-9.

Zhang, P., Wong, C., DePinho, R.A., Harper, J.W. und Elledge, S.J. (1998). Cooperation between the Cdk inhibitors p27(KIP1) and p57(KIP2) in the control of tissue growth and development. *Genes Dev*, **12**: 3162-3167.

Zugerman, C. (1990). Chloracne. Clinical manifestations and etiology. *Dermatol Clin*, **8**: 209-213.

Zuniga-Pflücker, J.C. und Lenardo, M.J. (1996). Regulation of thymocyte development from immature progenitors. *Curr Opin Immunol*, **8**: 215-224.