

# Untersuchungen zur Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -Signalweg sowie deren Auswirkungen auf die p53-, ER $\alpha$ - und NFAT-Signalwege in MCF-7-Zellen

## Dissertation

zum Erlangen des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

angefertigt am  
Institut für Anatomie und Zellbiologie

vorgelegt der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von  
Frau Diplom-Biochemikerin Anja Seifert  
geboren am 07. Februar 1980 in Halle

Gutachter /in

1. Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer

2. Prof. Dr. G.-J. Krauß

3. Prof. Dr. R. H. Wenger

öffentliche Verteidigung: 28.04.2008

**urn:nbn:de:gbv:3-000013637**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013637>]

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Anatomie und Zellbiologie an der Martin-Luther-Universität in der Zeit vom 01.11.2004 bis zum 30.09.2007 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer angefertigt.

*„Man kann ein Problem nicht mit der gleichen Denkweise lösen, mit der es erschaffen wurde.“*

*Albert Einstein*

---

	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1 – 22</b>
1.1 Das Mammakarzinom	1
1.2 Die bHLH/PAS-Proteinfamilie	3
1.3 Der HIF-1 $\alpha$ -Signalweg	3
1.3.1 Die Struktur von HIF-1 $\alpha$	4
1.3.2 Normoxische Regulation von HIF-1 $\alpha$	4
1.3.3 HIF-Hydroxylasen	7
1.3.4 Hypoxische Regulation von HIF-1 $\alpha$	9
1.3.5 Wechselwirkung zwischen dem HIF-1 $\alpha$ - und dem p53-Signalweg	11
1.3.6 Hypoxie-induzierte zelluläre Antwort	12
1.4 Der AhR-Signalweg	12
1.4.1 Die Liganden des AhR	13
1.4.2 Die Struktur des AhR	14
1.4.3 Der AhR-Signalweg	15
1.4.4 Die Interferenz zwischen dem AhR- und dem Östrogen-Rezeptor $\alpha$ - (ER $\alpha$ ) Signalweg	17
1.4.5 TCDD- (AhR- vermittelte) induzierte zelluläre Antwort	19
1.5 Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -Signalweg	20
1.6 Zielstellung	22
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>23 - 43</b>
2.1 Zellkultur	23
2.1.1 Kultivierte Zelllinien	23
2.1.2 Kultur und Stimulation der Zelllinien	23
2.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen	25
2.1.4 Durchflußzytometrie	26
2.1.5 Migrationstest	26
2.2 Transfektion	27
2.2.1 Transfektion mit kationischen Lipiden	27
2.2.1.1 Transfektion von exogener DNA	27
2.2.1.2 Transfektion von siRNA	28
2.2.1 Calciumphosphat-Kopräzipitation	29
2.3 Reportergenanalysen	30
2.4 Genexpressionsanalysen	31
2.4.1 RNA-Isolierung und Quantifizierung	31
2.4.2 Reverse Transkription	32
2.4.3 Polymerase Kettenreaktion	32
2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese	33
2.4.5 <i>In vitro</i> Transkription	33
2.4.6 <i>Real-time</i> PCR	35

	<b>Seite</b>
2.5 Proteinchemische Untersuchungen	37
2.5.1 Proteinisolation und Quantifizierung	37
2.5.2 Fraktionierung	37
2.5.3 SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese	38
2.5.4 Western Blot	39
2.5.4.1 Proteintransfer	39
2.5.4.2 Blocken der Nitrozellulosemembran	39
2.5.4.3 Inkubation mit Primär und Sekundär-Antikörper	39
2.5.4.4 Detektion	40
2.5.4.5 Strippen der Membran	40
2.5.5 Fluoreszenzmikroskopie	40
2.5.6 Quantifizierung der ATX-Enzymaktivität	41
2.6 Klonierung und Vektoren	41
2.6.1 Transformation und Selektion der Klone	41
2.6.2 Plasmidpräparationen	42
2.6.2.1 Mini-Plasmidpräparation	42
2.6.2.2 Midi-Plasmidpräparation	42
2.6.2.3 Glycerinkulturen	43
2.6.3 Restriktionsverdau	43
2.7 Statistische Analyse	43
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>44 – 72</b>
3.1 Aktivierung des AhR-Signalweges nach Stimulation mit TCDD in MCF-7-Zellen	44
3.2 Aktivierung des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges nach Stimulation mit Hypoxie in MCF-7-Zellen	46
3.3 Aktivierung des AhR-Signalweges nach Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie	47
3.4 Aktivierung des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges nach Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie	50
3.5 Einfluss von TCDD und Hypoxie auf den p53- und den ER $\alpha$ -Signalweg	52
3.6 Aktivierung des NFATc1-Signalweges nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie	59
3.7 Expression von PHD2 – Ist PHD2 der Mediator der Interferenz?	64
3.8 Expression von Hsp90 and Rack1 – Sind beide Proteine Mediatoren der Interferenz?	67
<b>4. Diskussion</b>	<b>73 – 91</b>
4.1 Aktivierung des AhR- und des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges durch TCDD und/oder Hypoxie	73
4.2 Einfluss von TCDD und Hypoxie auf den p53- und den ER $\alpha$ -Signalweg	77

	<b>Seite</b>	
4.3	Aktivierung des NFAT-Signalweges durch TCDD oder Hypoxie	82
4.4	Rolle von PHD2 in der Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -Signalweg	86
4.5	Der Einfluss von Hsp90 und Rack1 auf die Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -Signalweg	88
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>92 - 94</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>95 - 110</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang A</b>	<b>I – XIII</b>
7.1	Weitere Versuchsergebnisse	I
7.1.1	Daten zum Abschnitt „Aktivierung des AhR-Signalweges durch TCDD und/oder Hypoxie“	I
7.1.2	Daten zum Abschnitt „Aktivierung des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges durch TCDD und/oder Hypoxie“	II
7.1.3	Daten zum Abschnitt „Einfluss von TCDD und Hypoxie auf den p53- und den ER $\alpha$ -Signalweg“	IV
7.1.4	Daten zum Abschnitt „Aktivierung des NFATc1-Signalweges durch TCDD oder Hypoxie“	VI
7.1.5	Daten zum Abschnitt „Expression von PHD2 – Ist PHD2 der Mediator der Interferenz?“	VII
7.1.6	Daten zum Abschnitt „Expression of Hsp90 and Rack1 – Sind beide Proteine Mediatoren der Interferenz?“	X
7.2	Mikroarray-Daten	X
7.2.1	Durchführung der Mikroarray-Analyse	X
7.2.2	Ergebnisse der Mikroarray-Analyse	XI
<b>8.</b>	<b>Anhang B</b>	<b>XIV – XXVI</b>
8.1	Pufferlösungen	XIV
8.2	Verwendete Geräte	XV
8.3	Primer	XVI
8.4	Verwendete Vektoren/ siRNA	XVII
8.4.1	Sequenzen der verwendeten siRNA	XVII
8.4.2	verwendeten Vektoren	XVIII
8.5	Standardkurven <i>Real-time</i> PCR	XIX
8.5.1	Relative Quantifizierung	XIX
8.5.2	Absolute Quantifizierung	XX
8.6	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	XXII
8.6.1	Abbildungsverzeichnis	XXII
8.6.2	Tabellenverzeichnis	XXIII
8.7	Abkürzungsverzeichnis	XXIV

# 1 Einleitung

Brustkrebs ist das häufigste Karzinom bei Frauen (Dumitrescu *et al.* 2005). Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass es Unterschiede in der Morbidität in verschiedenen geographischen Gebieten gibt (Boyle *et al.* 2005; Lacey *et al.* 2002). Regionale Unterschiede in der Belastung mit EDCs (*endocrine disrupting chemicals*), die die normale Funktion von Hormonen beeinflussen, können eine Ursache für diese Unterschiede sein (Amaral Mendes *et al.* 2002). EDC sind endokrin aktive Substanzen. 2,3,7,8-Tetrachloro-dibenzo-*para*-dioxin (TCDD, Dioxin) ist ein solcher Umweltschadstoff mit endokriner Wirkung. Die karzinogene Wirkung von TCDD wurde nach dem industriellen Unfall in Seveso (Italien) offensichtlich. Ein erhöhtes Brustkrebsrisiko wurde bei Frauen mit einer erhöhten Dioxin-Konzentration im Serum nachgewiesen (Warner *et al.* 2002). TCDD kann als lipophile Chemikalie im Fettgewebe der Brust akkumulieren (Abraham *et al.* 1996). Dabei treffen Umweltchemikalien, wie TCDD (welcher auch als xenobiotischer Stressor bezeichnet wird), im Mammakarzinom auf heterogen über das Karzinom verteilte hypoxische Bereiche. Vaupel und Koautoren (Vaupel *et al.* 2002) konnten zeigen, dass der mittlere Sauerstoffpartialdruck im Mammakarzinomen im Vergleich zum normalen Brustgewebe verringert ist. Sowohl hypoxische als auch xenobiotische Stressoren verändern das Proteom sowie die molekularen Mechanismen, welche die Regulation des Zellstoffwechsels und der Proliferation stören und die maligne Progression von Mammakarzinomen regulieren. Im Folgenden werden die grundlegenden Mechanismen erläutert, die durch Exposition mit TCDD und Hypoxie hervorgerufen werden.

## 1.1 Das Mammakarzinom

Die weibliche Brustdrüse (*Glandula mammaria*) besteht aus je 15 bis 20 bindegeweblich getrennten Lappen (*Lobi*) mit Milchgängen (*Ductus lactiferi*), die in der Mamille (*Papilla mammaria*) münden. Diese ist vom Warzenhof (*Areola mammaria*) umgeben, in die multiple apokrine Drüsen münden. Ein Lobus besteht aus 10 bis 15 Lobuli, welche in mehrere Azini unterteilt sind. Die Brustdrüse entwickelt sich zur adulten Form unter dem Einfluss von Östrogen mit Längenwachstum der Milchgänge, Entfaltung der Gangepithelien und Bildung der Azini. Progesteron führt zur Ausdifferenzierung der Azini. Gleichzeitig kommt es zur Ausformung der Mamille und des Warzenhofes. In der Schwangerschaft folgt nach Erhöhung der Östrogen- und Progesteronkonzentration die Vergrößerung der Azini sowie die Aussprossung von weiteren Milchgängen (Goerke *et al.* 2002).

Die häufigste maligne Erkrankung der Frau ist das Mammakarzinom. Nach derzeitigen Schätzungen erkrankt jede elfte Frau (9 %) im Laufe ihres Lebens an einem Mamma-

karzinom. Nach histologischer Klassifizierung der WHO (*World Health Organisation*) werden verschiedene nichtinvasive Mammakarzinome (duktales und lobuläres Karzinom *in situ* (DCIS, LCIS) und invasive Mammakarzinome (invasive duktales und lobuläre Karzinome; weiterhin muzinöse, medulläre, papilläre, tubuläre, adenoidzystische und sekretorische Karzinome) unterschieden. Zusätzlich gibt es das Pagetkarzinom der Mamille. Eine weitere Klassifizierung wird durch das pTNM-System nach der Tumorausbreitung, dem Ausmaß des Lymphknotenbefalls sowie nach Fernmetastasen vorgenommen. Etwa 75 % der Mammakarzinome gehen vom Gangepithel aus und werden damit als invasive duktales Karzinome klassifiziert (Frenski *et al.* 2002; Goerke *et al.* 2002). Primärtumoren und Metastasen weisen dabei einen niedrigeren Sauerstoffpartialdruck auf als das umliegende gesunde Gewebe. Diese Gewebhypoxie führt zu einer herabgesetzten Radiosensitivität (Vaupel *et al.* 2002; Vaupel *et al.* 1998; Zhou *et al.* 2006).

Bekanntes Risikofaktoren für das Mammakarzinom sind eine familiäre Disposition und spontane genetische Veränderungen (Dhingra *et al.* 1995; Goerke *et al.* 2002). Frauen, deren weibliche Verwandte ersten Grades an einem Mammakarzinom erkrankt waren, haben ein zwei- bis neunfach erhöhtes Erkrankungsrisiko. Mutationen in den Genen *BRCA1* oder *BRCA2* sind die Ursache für ca. 10 % aller Brustkrebserkrankungen (McPherson *et al.* 2000). Ebenso erhöhen hormonelle Einflüsse wie Nulliparität, späte Erstparität, frühe Menarche und späte Menopause das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, auf das 1,5- bis 3-fache (Azzena *et al.* 1994; Dumitrescu *et al.* 2005; Goerke *et al.* 2002).

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass es regionale Unterschiede in der Morbidität z.B. in Europa und in Nord- und Südamerika gibt (Boyle *et al.* 2005; Lacey *et al.* 2002). Diese Unterschiede können sicherlich auf unbekannte Umwelteinflüsse zurückzuführen sein. Besonders Chemikalien, die die normale Funktion von Hormonen beeinflussen, sogenannte EDCs, sind hier von Bedeutung (Amaral Mendes *et al.* 2002). Zu diesen Chemikalien gehört z.B. das Östrogen-Analogon Diethylstilöströl (DES), das zwischen 1953 und 1971 Frauen zum Vermeiden einer Fehlgeburt verabreicht wurde. Die Töchter dieser Frauen haben, neben dem Risiko an anderen Tumoren zu erkranken, ein zweifach erhöhtes Brustkrebsrisiko (Palmer *et al.* 2006). Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass auch die Exposition mit Benzenen, organischen Lösungsmitteln oder polyzyklischen aromatischen Hydrokarbonen (PAHs) mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert ist (Brody *et al.* 2003). Der zu der Substanzklasse PAH gehörende Umweltschadstoff TCDD ist nach einem industriellen Unfall in Seveso (Italien) freigesetzt worden. Danach wurde beobachtet, dass eine 10-fach erhöhte Dioxin-Konzentration im Serum von Frauen das Brustkrebsrisiko verdoppelte (Warner *et al.* 2002).

## 1.2 Die bHLH/PAS-Proteinfamilie

Die bHLH (*basic helix-loop-helix*)/PAS (Per-ARNT-SIM)-Proteinfamilie reguliert zahlreiche essentielle physiologische Prozesse. Ein gemeinsames Strukturmotiv ist die basische Region dieser Moleküle gefolgt von einem *helix-loop-helix* (HLH)-Motiv. Das zweite Strukturmotiv ist die PAS-Domäne. PAS ist das Akronym der ersten drei identifizierten Proteine mit diesem Motiv: das in *Drosophila* identifizierte Protein Per (*Peroid*), das im Menschen identifizierte Protein ARNT (*aryl hydrocarbon nuclear receptor translocator*) und das in *Drosophila* identifizierte Protein SIM (*Single-minded*). Die ubiquitär vorkommenden bHLH/PAS-Proteine sind Transkriptionsfaktoren. Diese werden in zwei Klassen unterteilt. Die erste Klasse der bHLH/PAS-Proteine kann weder Homodimere bilden noch mit anderen Proteinen dieser Klasse dimerisieren. Dazu zählen z.B. der Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) und der Hypoxie-induzierte Faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). Um einen aktiven Transkriptionsfaktorkomplex zu bilden, dimerisieren diese Proteine mit den zur Klasse 2 gehörenden bHLH/PAS-Proteinen. Das am besten charakterisierte Protein dieser Klasse ist ARNT (Kewley *et al.* 2004). In der vorliegenden Arbeit stehen die Transkriptionsfaktoren AhR und HIF-1 $\alpha$  im Mittelpunkt der Untersuchungen. AhR wird durch zahlreiche Umweltschadstoffe aktiviert und HIF-1 $\alpha$  vermittelt die Antwort auf eine eingeschränkte Sauerstoffversorgung.

## 1.3 Der HIF-1 $\alpha$ -Signalweg

Biochemiker definieren Hypoxie als Sauerstoff-limitierten Elektronentransport. Physiologen dagegen definieren Hypoxie als eingeschränkte Sauerstoffversorgung bzw. eine Erniedrigung des Sauerstoffpartialdruckes, welche die normale Funktion von Geweben, Organen und Zellen einschränkt. Drei Ursachen einer Sauerstoffmangelversorgung stehen im Vordergrund: die Erniedrigung des Sauerstoffpartialdruckes im arteriellen Blut (arterielle Hypoxie), die Herabsetzung der Sauerstoffkapazität des Blutes (Anämie) und die Einschränkung der Organ-durchblutung (Ischämie) (Hockel *et al.* 2001). Vaupel *et al.* (Vaupel *et al.* 2002) konnten zeigen, dass der mittlere Sauerstoffpartialdruck im normalen Brustgewebe bei 65 mmHg (8,55 % O<sub>2</sub>) und in Mammakarzinomen des Stadiums T1B bis T4 bei 28 mmHg (3,68 % O<sub>2</sub>) liegt. In dieser Arbeit wird ein verringerter Sauerstoffpartialdruck, der zur Stabilisierung des sauerstoffsensitiven Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  führt, als Hypoxie definiert.

### 1.3.1 Die Struktur von HIF-1 $\alpha$

HIF-1 $\alpha$ , ein Mitglied der bHLH/PAS-Proteinfamilie (Abb. 1-1), ist ein aus 826 Aminosäuren (As) bestehendes Protein. Die N-terminale Hälfte des Proteins besteht aus der basischen Domäne (As 17-30), der HLH-Domäne (As 31-71) und den beiden PAS-Domänen (As 85-158 und 228-298), die für die Heterodimerisierung mit ARNT sowie der DNA-Bindung an

die HIF-1 $\alpha$ -spezifische Erkennungssequenz erforderlich sind. Die C-terminale Hälfte des Proteins ist für den Abbau und die Transaktivierung von HIF-1 $\alpha$  notwendig. Über die N- und C-terminale Transaktivierungsdomäne (N-TAD: As 531-575 und TAD-C: As 786-826) erfolgt die Interaktion mit Kofaktoren. Die sauerstoffabhängige Degradationsdomäne (ODDD, *oxygen-dependent degradation domain*), die von der N-TAD überlagert wird, ist für die negative Regulation von HIF-1 $\alpha$  verantwortlich. Die ODD-Domäne enthält zwei PEST-ähnliche Motive, deren Sequenz reich an den Aminosäuren Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) ist. Dieses Motiv ist für die geringe Stabilität des Proteins verantwortlich, so dass die Halbwertszeit von HIF-1 $\alpha$  nur etwa 10 - 20 Minuten beträgt (Bardos *et al.* 2004; Chun *et al.* 2002).

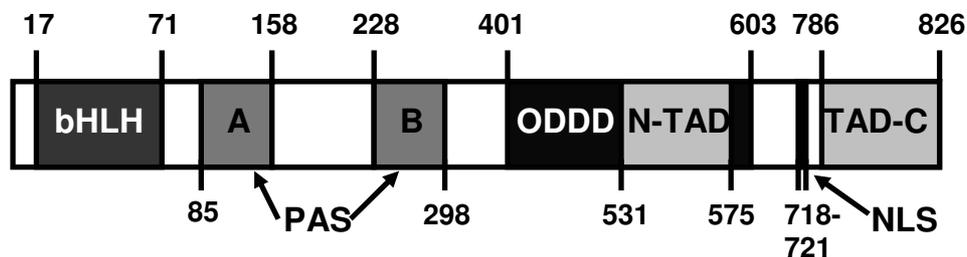


Abb. 1-1: Schema der HIF-1 $\alpha$ -Struktur

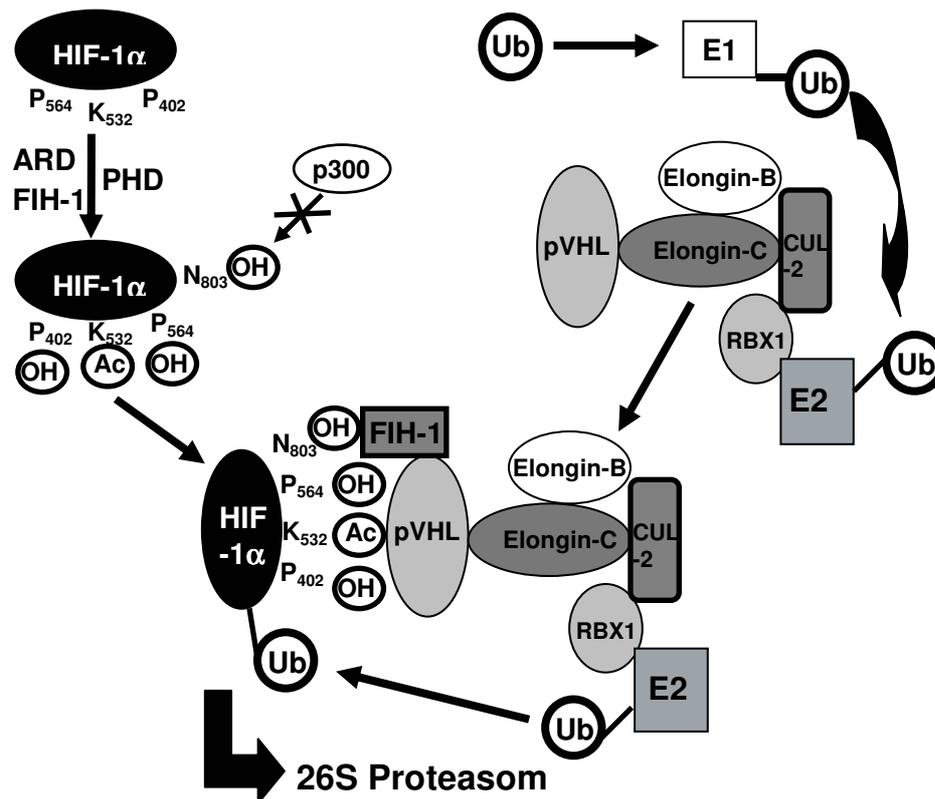
bHLH, *basic helix-loop-helix*; PAS, *Per/ARNT/SIM*; ODDD, *oxygen-dependent degradation domain*; TAD, *Transaktivierungsdomäne*; NLS, *Kernlokalisierungssignal*

### 1.3.2 Normoxische Regulation von HIF-1 $\alpha$

Die Regulation der Stabilität und damit der transkriptionellen Aktivität von HIF-1 $\alpha$  wird durch posttranskriptionelle Modifikationen, wie Hydroxylierung, Ubiquitinylierung, Acetylierung und Phosphorylierung vermittelt (Ke *et al.* 2006). Diese Modifikationen werden in verschiedenen Domänen vorgenommen. Hydroxylierung und Acetylierung führen zum proteosomalen Abbau und zur Inaktivierung von HIF-1 $\alpha$  (siehe Abbildung 1-2).

Das HIF-1 $\alpha$ -Protein wird konstitutiv exprimiert. Unter normoxischen Bedingungen (21 % O<sub>2</sub>) werden in einer sauerstoffabhängigen Reaktion das Prolin 402 und das Prolin 564 in der ODD-Domäne von HIF-1 $\alpha$  durch HIF-spezifische Prolylhydroxylasen (PHDs) hydroxyliert (Freeman *et al.* 2003). Als Folge wird HIF-1 $\alpha$  abgebaut. Die ODD-Domäne wird zusätzlich durch die Acetyltransferase ARD1 (*arrest defective protein 1 homologue*) am Lysin 532 durch das Transferieren einer Acetylgruppe vom Acetyl-CoA acetyliert (Jeong *et al.* 2002). Eine weitere Hydroxylierung wird in einer sauerstoffabhängigen Reaktion durch die Asparagylhydroxylase FIH-1 (*factor-inhibiting HIF-1*) am Asparagin 803 in der TAD-C-Domäne katalysiert. Diese Hydroxylierung verhindert die Interaktion von HIF-1 $\alpha$  mit dem Ko-Aktivatoren CBP/p300 (Lando *et al.* 2002; Ruas *et al.* 2002). Röntgen-kristallographische Studien

haben gezeigt, dass pVHL (*protein von Hippel Lindau*) eine Bindungstasche besitzt, in die Hydroxyproline binden, und dass diese Bindung hochspezifisch ist (Hon *et al.* 2002; Ivan *et al.* 2001; Min *et al.* 2002). Die Bindung der Hydroxyproline des HIF-1 $\alpha$  mit pVHL wird durch das acetylierte Lysin in der ODD-Domäne stabilisiert (Jeong *et al.* 2002). Zusätzlich bildet FIH-1 Homodimere und bindet an pVHL. Dadurch wird eine Bindung von pVHL über FIH-1 an HIF-1 $\alpha$  möglich (Dann *et al.* 2002; Lee *et al.* 2003).



**Abb. 1-2: Proteosomaler Abbau von HIF-1 $\alpha$**

**Die Hydroxylierung und Acetylierung führen zur Bindung des Proteins von-Hippel-Lindau und danach zum proteosomalen Abbau und zur Inaktivierung von HIF-1 $\alpha$ .**

Das Protein pVHL ist eine E3-Ubiquitinligase und vermittelt den Abbau von HIF-1 $\alpha$ . Um den Abbau von HIF-1 $\alpha$  zu beschreiben, wird der allgemeine Mechanismus der Ubiquitinylierung und die Funktion des Proteins pVHL zusammengefasst. Der Mechanismus der Ubiquitinylierung besteht aus den folgenden Reaktionen: In einer ATP-abhängigen Reaktion wird das Ubiquitin zuerst als ein energiereicher Thioester mit einem Cysteinrest der E1-Ubiquitinligase verbunden. In einer nachfolgenden Transesterifizierung wird das Ubiquitin auf einen Cysteinrest im aktiven Zentrum der E2-Ubiquitinligase übertragen. Anschließend assoziiert die E2-Ubiquitinligase mit der E3-Ubiquitinligase und bildet den Ubiquitinligasekomplex. Die E3-Ubiquitinligase überträgt das Ubiquitin auf ein Lysin des entsprechenden Substrates. Die E3-Ubiquitinligasen werden in drei Klassen unterteilt: die Homologen zu E6-AP C-Terminus

(HECT), die *Really Interesting New Gene* (RING) und die UFD2-homologen (U-Box) Proteine (Pickart *et al.* 2004). Das Protein pVHL gehört zu den RING E3-Ubiquitinligasen. Die Proteine der RING-Familie sind katalytisch inaktiv, d.h. diese gehen keine Thioesterbindung mit Ubiquitin ein. Die RING-Familie rekrutiert das E2-Enzym und bringt es in die Nähe des Substrates. Das Ubiquitin wird direkt vom E2-Enzym auf das Substrat übertragen, wobei die Konformation der RING E3-Ubiquitinligase die katalytische Aktivität der E2-Ubiquitinligase verstärkt (Pickart *et al.* 2001).

Das pVHL-Protein bildet einen Komplex mit Elongin B/C, Cul2 und Rbx1 und ähnelt damit dem SCF (Skp1-Cul1-F-box Proteine)-Komplex der Cullin (Cul)-abhängigen Ubiquitinligasen. Das Elongin C bindet eine zur F-Box homologe Sequenz im pVHL (Kamura *et al.* 2004; Stebbins *et al.* 1999). pVHL selbst besteht aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domäne. Die  $\alpha$ -Domäne des pVHL bindet an Elongin C, das mit Elongin B assoziiert ist (Kibel *et al.* 1995; Ohh *et al.* 2000; Semenza *et al.* 2006). Dieser VCB-Komplex rekrutiert Cul2-Rbx1 und bildet damit den aktiven Ubiquitinligasekomplex (Kamura *et al.* 2004; Kamura *et al.* 2000). Anschließend interagiert die  $\beta$ -Domäne von pVHL mit HIF-1 $\alpha$  und katalysiert den Transfer von Ubiquitin an spezifische Lysinreste (K532, K538, K547) von HIF-1 $\alpha$  (Paltoglou *et al.* 2006). Kovalent an das Substrat gebundenes Ubiquitin ist das Signal für die Erkennung durch das 26S Proteasom, das den Abbau des Substrates (HIF-1 $\alpha$ ) durchführt (Kallio *et al.* 1999; Pickart *et al.* 1997).

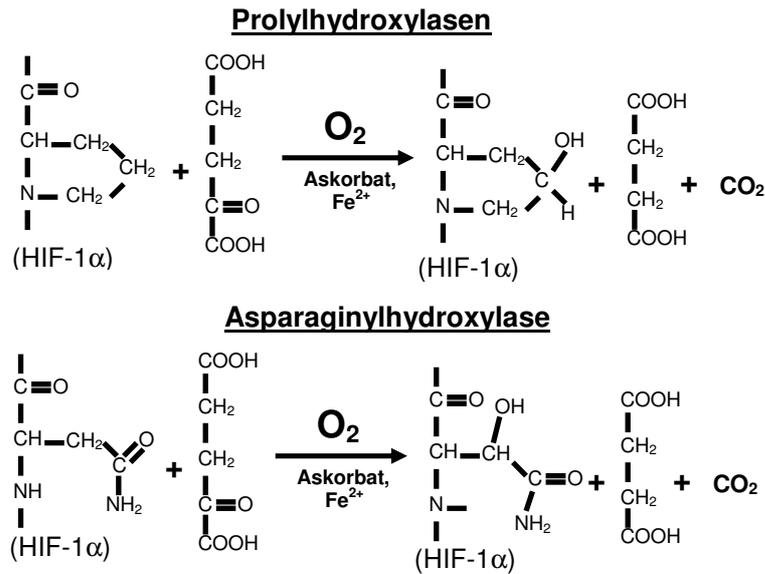
Weiterhin sei erwähnt, dass der Abbau und damit die Inaktivierung von HIF-1 $\alpha$ , die unter normoxischen Bedingungen ablaufen, durch eine Steigerung der HIF-1 $\alpha$ -Translation überwunden werden können. Bekannt sind unter normoxischen Bedingungen die Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  durch Wachstumsfaktoren, wie z.B. Insulin und EGF (epithelialer Wachstumsfaktor) (Jiang *et al.* 2001; Zhong *et al.* 2000), IGF (*insulin-like growth factor*) (Slomiany *et al.* 2004), HGF (Hepatozytenwachstumsfaktor) (Tacchini *et al.* 2001), Interleukinen wie IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ ) (El Awad *et al.* 2000; Stiehl *et al.* 2002), IL-8 (Interleukin-8) (Kim *et al.* 2006), TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) (Hellwig-Burgel *et al.* 1999), oder durch Hormone wie Androgene (Mabjeesh *et al.* 2003) und 4-OH-Östradiol (Gao *et al.* 2004). Die Wachstumsfaktoren binden an die spezifischen Rezeptoren, wodurch die assoziierten Tyrosinkinase und anschließend die Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) aktiviert werden. Die PI3K aktiviert die Serin/Threonin-Kinase Akt (ebenso bekannt als Protein Kinase B) sowie FRAP (FKBP-Rapamycin-assoziiertes Protein, auch bekannt als mTOR) und erhöht damit die cap-abhängige Translation von Proteinen. Bei der Translationsinitiation sind zwei Reaktionen limitierend: die Bildung des aktiven eIF4F Komplex (eIF4E, eIF4G und eIF4A) und des eIF2-GTP/Met-

tRNA ternären Komplex. FRAP phosphoryliert und aktiviert das translationale Protein eIF4E Bindeprotein 1 (4E-BP1) und die p70 S6 Kinase (p70<sup>S6K</sup>). Die Phosphorylierung des 4E-BP1 zerstört die inhibitorische Interaktion mit dem eukaryotischen Initiationsfaktor 4E (eIF4E). Die dadurch aktivierte p70<sup>S6K</sup> phosphoryliert das 40S ribosomale Protein S6 und steigert dadurch unter anderem die Translation von HIF-1 $\alpha$  (Bardos *et al.* 2004; Hirota *et al.* 2005; Lee *et al.* 2004).

### 1.3.3 HIF-Hydroxylasen

Die HIF-Hydroxylasen werden in der vorliegenden Arbeit untersucht. Um die wichtigen Prozesse zu verstehen, die zum Abbau von HIF-1 $\alpha$  führen, werden die HIF-Hydroxylasen im folgenden Abschnitt beschrieben. Es sind drei verschiedene Gene bekannt, die für Proteine mit Prolylhydroxylase-Aktivität kodieren. Diese Gene sind verwandt mit dem *egl-9* Gen aus *C. elegans* und werden deshalb EGL-Nine Homologe 1, 2 und 3 genannt (Freeman *et al.* 2003). Epstein und Koautoren (Epstein *et al.* 2001) zeigten, dass Säugetier-Homologe zum Protein EGL-9 aus *C. elegans* als HIF-Prolylhydroxylase arbeiten. Deshalb werden die Proteine alternativ als *prolyl hydroxylase domain containing* Proteine PHD2, PHD1, PHD3 bezeichnet. Die PHDs sind Mitglieder der Eisen (II), 2-oxo-glutarat-abhängigen Dioxygenase-Familie (Freeman *et al.* 2003). Diese Enzyme benötigen Sauerstoff als Ko-Substrat. In der Hydroxylierungsreaktion (Abb. 1-3) wird ein Sauerstoff-Atom auf ein Prolin in HIF-1 $\alpha$  übertragen, wobei ein Hydroxyprolin entsteht. Zusätzlich wird das 2-Oxoglutarat dekarboxyliert und das zweite Sauerstoff-Atom transferiert. Als Produkt dieser Reaktion entsteht Succinat und Kohlendioxid. PHDs nutzen neben Sauerstoff das Fe<sup>2+</sup> und Ascorbat als Ko-Faktoren. Fe<sup>2+</sup> wird für die Aktivierung des molekularen Sauerstoffes benötigt. Ascorbat wird für die Reaktivierung des reduzierten Fe<sup>3+</sup> benötigt. Es bindet an das aktive Zentrum nach der Dekarboxylierung (Berra *et al.* 2006).

PHDs hydroxylieren die Proline in HIF-1 $\alpha$ , die in einem konservierten LxxLAP Sequenzmotiv lokalisiert sind (Ivan *et al.* 2001). Die Reaktivität der PHDs für die Hydroxylierung des Prolins 564 hat folgende Priorität: PHD2>>PHD3>PHD1 (Freeman *et al.* 2003). Außerdem gibt es Unterschiede in der Spezifität der Hydroxylierung der beiden Proline in HIF-1 $\alpha$ . Alle drei PHDs können das Prolin 564 hydroxylieren, allerdings können nur PHD1 und PHD2 das Prolin 402 hydroxylieren. Außerdem ist der K<sub>m</sub>-Wert der PHD1 und PHD2 für das Prolin 402-enthaltene Peptid 20-fach bis 50-fach höher als für das Prolin 564-enthaltene Peptid (Huang *et al.* 2002).



**Abb. 1-3: Reaktionsschemata der HIF-Hydroxylasen**

Die PHDs sind effektive Sauerstoffsensoren mit einem  $K_m$ -Wert für Sauerstoff von 230  $\mu\text{M}$  - 250  $\mu\text{M}$ , der etwas über der atmosphärischen Sauerstoffkonzentration liegt (Hirota *et al.* 2005). Die PHD-Aktivität kann durch verschiedenste Faktoren beeinflusst werden. So können z.B. die Verringerung des intrazellulären Ascorbates oder kompetitive Inhibitoren des 2-Oxoglutarats zur Inhibierung der PHD-Aktivität führen (Pan *et al.* 2007). Mutationen, die eine Inhibierung der Aktivität der Succinatdehydrogenase zur Folge haben, führen zur Akkumulation von Succinat, wodurch die Aktivität der PHDs verringert wird. Hypoxie kann die Laktatkonzentration in Zellen auf 8 mM erhöhen. Deshalb kommt es anschließend zur Inaktivierung der PHDs und zur Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  (Lu *et al.* 2005). Der Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auf die PHD-Aktivität wird kontrovers diskutiert. Einerseits kann die Produktion von niedrigen Mengen ROS die PHD-Aktivität unter hypoxischen Bedingungen erhöhen (Callapina *et al.* 2005). Andererseits können ROS mit den Stoffwechselprozessen in den Mitochondrien interferieren, wodurch die Konzentrationen von Succinat und Fumarat erhöht werden. Diese beiden Metabolite des mitochondrialen Krebszyklus erhöhen die HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung durch Inhibierung der PHD-Aktivität (Acker *et al.* 2006; King *et al.* 2006). Außerdem können hohe ROS-Konzentrationen durch Oxidation des komplexierten Fe(II) zu Fe(III) im aktivem Zentrum der PHDs deren Aktivität inhibieren (Chandel *et al.* 2000).

Die drei PHD-Proteine werden in allen Geweben in unterschiedlichen Mengen exprimiert (Cioffi *et al.* 2003; Lieb *et al.* 2002). Allerdings unterscheidet sich die Lokalisation der PHDs in der Zelle. PHD1 ist ausschließlich im Kern, PHD2 hauptsächlich im Zytoplasma und PHD3 sowohl im Kern als auch im Zytoplasma lokalisiert (Metzen *et al.* 2003). Die PHD-

Expression kann auf drei verschiedene Weisen beeinflusst werden, z.B. erstens durch eine Hypoxie- sowie HIF-abhängige Regulation. PHD2 und PHD3 werden unter hypoxischen Bedingungen transkriptionell und HIF-abhängig induziert (Aprelikova *et al.* 2004; Pescador *et al.* 2005). Diese Induktion verursacht einen negativen Rückkopplungsmechanismus, der HIF unter hypoxischen Bedingungen destabilisieren kann (D'Angelo *et al.* 2003). Stiehl *et al.* (Stiehl *et al.* 2006) beschrieben die Kompensation von niedrigen Sauerstoffkonzentrationen durch erhöhte Expression der PHDs. Zweitens gibt es eine Hypoxie-abhängige, aber HIF-unabhängige Regulation. Die PHDs werden wie HIF-1 $\alpha$  über das 26S Proteasom abgebaut. Der Abbau der PHDs wird durch die E3-Ubiquitinligasen Siah1 und Siah2 vermittelt, die unter hypoxischen Bedingungen HIF-unabhängig transkriptionell induziert werden (Fukuba *et al.* 2007; Khurana *et al.* 2006; Nakayama *et al.* 2004; Tian *et al.* 2006). Außerdem kann als dritte Möglichkeit die PHD-Expression durch andere Stimulatoren als Hypoxie reguliert werden. Die PHD1-mRNA-Menge erhöht sich nach Östrogenstimulation in der Brustkrebs-zelllinie ZR75-5 (Tian *et al.* 2006). Das PHD3-Homologe in Ratten SM-20 wird durch Aktivierung von p53 induziert (Madden *et al.* 1996).

Der Vollständigkeit halber soll die bis heute einzig bekannte HIF-Asparaginyhydroxylase FIH1 erwähnt werden. Dieses Enzym ist eine Eisen (II), 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase. Es katalysiert die Hydroxylierung von Asparagin 803 in HIF-1 $\alpha$  nach dem bereits für die Prolyhydroxylasen beschriebenen Mechanismus (siehe Abb. 1-3). Bei dieser Reaktion entstehen jedoch als Produkte  $\beta$ -Hydroxyasparagin, Succinat und Kohlendioxid (Lando *et al.* 2002; McDonough *et al.* 2006). Der  $K_m$ -Wert für Sauerstoff ist im Gegensatz zu den PHDs für FIH1 um die Hälfte geringer (Hirota *et al.* 2005). FIH1 ist vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert und wird durch die E3-Ubiquitinligase Siah1 abgebaut (Fukuba *et al.* 2007).

### 1.3.4 Hypoxische Regulation von HIF-1 $\alpha$

Im Zytoplasma ist HIF-1 $\alpha$  über die PAS-B-Domäne an das Chaperon HSP90 (Hitze-schockprotein 90) gebunden, das HIF-1 $\alpha$  stabilisiert und gleichzeitig den nichtspezifischen Abbau dieses Proteins verhindert (Katschinski *et al.* 2004). Die Aktivierung des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges ist in Abbildung 1-4 dargestellt und wird für das Verständnis der vorliegenden Arbeit im folgenden Abschnitt detailliert beschrieben.

Die Hydroxylierung und Acetylierung von HIF-1 $\alpha$  wird unter hypoxischen Bedingungen inhibiert (Bardos *et al.* 2004; McNeill *et al.* 2002). Dadurch kann pVHL HIF-1 $\alpha$  nicht mehr für die Ubiquitylierung binden, wodurch HIF-1 $\alpha$  schnell akkumuliert und in den Kern transloziert (Jaakkola *et al.* 2001; Pouyssegur *et al.* 2006). Im Kern konkurriert ARNT mit HSP90 um die Bindung an die HLH- und PAS-Domäne von HIF-1 $\alpha$  (Isaacs *et al.* 2004). Die

Heterodimerisierung mit ARNT - ein Protein, das ebenfalls zur Familie der bHLH/PAS Proteine gehört (Kewley *et al.* 2004) - führt zu einer Konformationsänderung in HIF-1 $\alpha$ , wodurch ein aktiver Transkriptionsfaktorkomplex gebildet wird (Isaacs *et al.* 2004; Kallio *et al.* 1997).

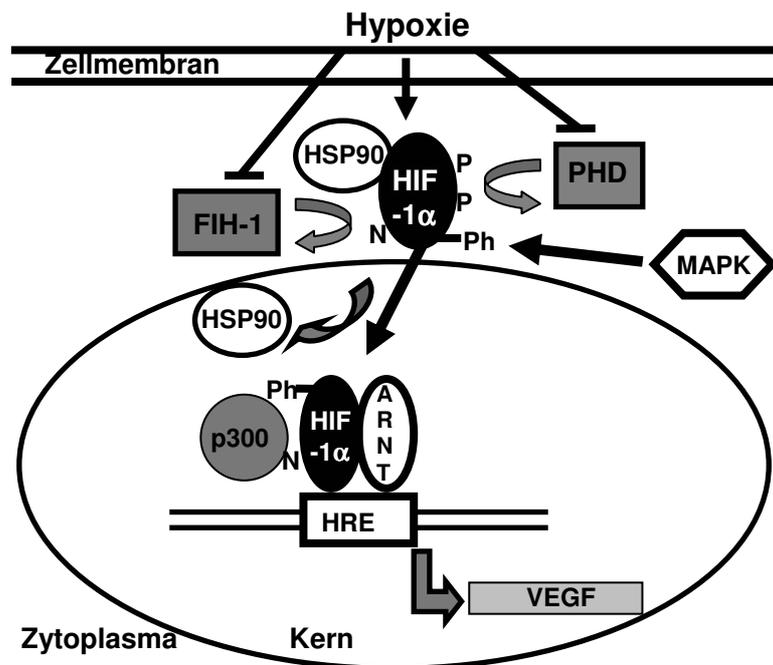


Abb. 1-4: Der HIF-1 $\alpha$ -Signalweg

**Die Inhibierung der Hydroxylierung und Acetylierung von HIF-1 $\alpha$  unter hypoxischen Bedingungen führen zur Stabilisierung und Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors. Das somit aktivierte HIF-1 $\alpha$  heterodimerisiert mit ARNT und induziert die Transkription der Zielgene.**

Der aktive HIF-1 $\alpha$ /ARNT-Komplex kann durch die Interaktion der C-TAD-Domäne am nicht hydroxylierten Asparagin 803 von HIF-1 $\alpha$  mit der CH1-Domäne des Ko-Faktors p300 transaktiviert werden (Ruas *et al.* 2002). Der Ko-Faktor p300 ist eine Histonacetyltransferase, die durch viele Transkriptionsfaktoren rekrutiert werden kann. Das Protein p300 kann verschiedene Ko-Aktivatoren rekrutieren, wie z.B. SRC1, TIF2 und REF1 (Liu *et al.* 2004; Ruas *et al.* 2005).

Der aktive Transkriptionsfaktorkomplex bindet anschließend an die Kernsequenz des HIF-spezifischen *Response-Elements* HRE (Hypoxie Responseelement, 5'-CACGTA-3') (Kinoshita *et al.* 2004) im Promotor der Zielgene und induziert deren Transkription. Zahlreiche Hypoxie-regulierte Gene wurden bis heute beschrieben. Die endgültige Identifizierung des HREs im Promotor der Zielgene steht oftmals noch aus (Bando *et al.* 2003; Choi *et al.* 2003). Seit langem bekannte Zielgene von HIF-1 $\alpha$  sind der Transferrinrezeptor (Lok *et al.* 1999), das Erythropoietin (Beck *et al.* 1991) und VEGF (Ruohola *et al.* 1999).

Einige Studien weisen außerdem darauf hin, dass MAPK (Mitogen aktivierte Proteinkinasen) HIF-1 $\alpha$  phosphorylieren (Richard *et al.* 1999) und die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 $\alpha$  erhöhen (Comerford *et al.* 2004; Lee *et al.* 2002; Sang *et al.* 2003). Die Bedeutung der HIF-1 $\alpha$ -Phosphorylierung ist bis heute nicht geklärt.

### 1.3.5 Wechselwirkungen zwischen dem HIF1 $\alpha$ - und dem p53-Signalweg

Ein weiterer wichtiger Punkt der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit den Wechselwirkungen zwischen dem HIF-1 $\alpha$ - und dem p53-Signalweg. Das Protein p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt ist und z.B. durch DNA-Schäden aktiviert wird. Der Tumorsuppressor p53 ist ein im Kern lokalisiertes Protein mit einer kurzen Halbwertszeit, das hauptsächlich durch posttranskriptionelle Modifikationen reguliert wird. Die Stabilisierung und Transaktivierung von p53 wird durch Acetylierung sowie Phosphorylierung am Serin 15 durch Rekrutierung der ATM (*ataxia telangiectasia mutated*)-Kinase ermöglicht (Horn *et al.* 2007). Der aktivierte Transkriptionsfaktor p53 bindet an das p53-spezifische *Response-Element* (p53RE) (el-Deiry *et al.* 1992) und induziert die Transkription der Zielgene (Wei *et al.* 2006). Einige bekannte Zielgene von p53 sind z.B. die RING E3-Ubiquitinligase mdm2 (*mouse double minute 2*) (Wu *et al.* 1993) und vier verschiedene Phosphatasen Wip1, Mkp1, Pac1 and Dusp5, welche durch ihre Aktivität die MAPK-Signalwege beeinflussen können (Wu *et al.* 2004). Hdm2 ist das humane Homolog zum mdm2 der Maus, die den Abbau von p53 vermittelt (Pinkas *et al.* 1999). Durch einen Ubiquitin-abhängigen Mechanismus wird p53 über das 26S Proteasom abgebaut.

Starke hypoxische bis anoxische Bedingungen aktivieren den p53-Signalweg, wobei der Mechanismus bis heute nicht vollständig aufgeklärt ist. HIF-1 $\alpha$  kann an Hdm2 binden und den Abbau von p53 inhibieren (Chen *et al.* 2003). Zusätzlich ist eine direkte Bindung von HIF-1 $\alpha$  an p53 möglich, wodurch p53 stabilisiert wird (Fels *et al.* 2005). Das Protein pVHL kann ebenfalls mit p53 interagieren, wodurch die Phosphorylierung am Serin 15 durch Rekrutierung der ATM-Kinase, Acetylierung und Aktivierung von p53 gefördert wird. p53 bindet an die  $\alpha$ -Domäne von pVHL. Es wird angenommen, das Elongin C, welches im pVHL-HIF-1 $\alpha$ -Komplex an pVHL gebunden ist, mit p53 um die Bindung an der  $\alpha$ -Domäne konkurriert (Roe *et al.* 2006a). Gleichzeitig wird unter diesen Bedingungen die HIF-1 $\alpha$ -Aktivität durch das Konkurrieren mit p53 um den Ko-Faktor p300 inhibiert und die Hdm2-vermittelte Ubiquitinylierung von HIF-1 $\alpha$  und der 26S proteosomale Abbau gefördert (Ravi *et al.* 2000; Roe *et al.* 2006b).

### 1.3.6 Hypoxie-induzierte zelluläre Antwort

HIF-1 $\alpha$  ist essentiell für die normale Embryogenese. Das Ausschalten des HIF-1 $\alpha$ -Genes verursacht in Mäuseembryonen eine pathologische Blutgefäßentwicklung, wodurch diese in einem frühen Stadium der Fetalentwicklung sterben (Ryan *et al.* 1998). Außerdem ist HIF-1 $\alpha$  assoziiert mit der Karzinogenese von Zellen. Es ist im Dickdarm-, Brust- (Bos *et al.* 2001), Magen-, Lungen-, Ovar-, Pankreas- und Prostata-Karzinom überexprimiert (Zhong *et al.* 1999). Hypoxie induziert über die HIF-1 $\alpha$ -vermittelte Bildung des Proteins VEGF die Angiogenese. Nachgewiesen ist die VEGF-induzierte Blutgefäßbildung unter anderem in Ratten und Schweinen (Thomas *et al.* 1996). Von Bedeutung ist, dass Hypoxie abhängig von der eingesetzten Sauerstoffkonzentration die Proliferation, die Apoptose sowie die Migration von Tumorzellen beeinflusst. Carmeliet und Koautoren (Carmeliet *et al.* 1998) beschrieben, dass Hypoxie Apoptose induziert. Unterschiedlich beschrieben wurde der Einfluss der Hypoxie bzw. von HIF-1 $\alpha$  auf die Proliferation bzw. den Zellzyklus. Einerseits wurde ein Hypoxie-vermittelter G1-S-Phasenarrest beobachtet, der durch die Expression der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21 und p27 reguliert wird (Gardner *et al.* 2001; Goda *et al.* 2003). Andererseits ist eine hohe HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge mit erhöhter Proliferation und einer Ansammlung der Zellen in der späten S-G2-Phase verbunden (Bos *et al.* 2004). Außerdem erhöht Hypoxie die Migration der humanen Brustkrebstzelllinie MDA-MB-231 (Ridgway *et al.* 2005).

Die Adaptation an hypoxische Bedingungen wird begleitet durch das Absinken des pH-Wertes in der Zelle als Resultat einer erhöhten Produktion von Milchsäure. Die Ursache ist die anaerobe Glykolyse, die die Bildung von ATP unter sauerstoffreduzierten Bedingungen ermöglicht (Pasteur Effekt) (Seagroves *et al.* 2001; Wenger *et al.* 2002).

## 1.4 Der AhR-Signalweg

Die Wirkung einer großen Gruppe von Umweltschadstoffen bzw. Xenobiotika, wie z.B. TCDD, wird durch den AhR vermittelt (Schmidt *et al.* 1996).

### 1.4.1 Die Liganden des AhR

Die Liganden des AhR sind strukturell sehr unterschiedlich (Denison *et al.* 2003). Die Liganden lassen sich in die Klasse der synthetischen Liganden, die als Konsequenz anthropogener und nicht-biologischer Reaktionen entstehen, und in die Klasse der natürlich vorkommenden Liganden einteilen.

Zu den synthetischen Liganden des AHR zählen die nicht-halogenierten, polyzyklischen, aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH) sowie die halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe (HAH). Zur PAH-Gruppe gehören z.B. Benzanthracen, Benzoflavon, Benzo-

[a]pyren, die durch unvollständige Pyrolyse von Kohlenstoffquellen entstehen und in Dieselabgasen, im Zigarettenrauch und in stark gegrillten Lebensmitteln auftreten (Koss *et al.* 2004). Zur HAH-Gruppe zählen unter anderem die polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxine (PCDD), die polychlorierten Dibenzofurane (PCDF) und die polychlorierten Biphenyle (PCB). Die PCDD und PCDF haben keinen industriellen Nutzen, sondern entstehen als Nebenprodukte bei industriellen und thermischen Prozessen. Früher war die Herstellung und Verarbeitung chlorierter organischer Verbindungen sowie die Zellstoffbleichung eine Hauptquelle der PCDD und PCDF, während in der heutigen Zeit vor allem thermische Prozesse in Anwesenheit von Chlorverbindungen von Bedeutung sind. Dazu zählen z.B. die Müllverbrennung sowie die Verbrennung von Holz und fossilen Brennstoffen (Behnisch *et al.* 2001; Gribble *et al.* 1998).

Das in dieser Arbeit verwendete und bekannteste Dioxin aus der Klasse der PCDD ist das TCDD (Abb. 1-5). Im Vietnamkrieg wurde das TCDD-verunreinigte Herbizid „Agent Orange“ eingesetzt (Verger *et al.* 1994). Außerdem wurde TCDD bekannt, nachdem in Seveso (Italien) in einer Anlage zur Produktion von Pentachlorphenol eine Explosion mehrere Kilogramm Dioxin in die Umwelt freisetzte (Bertazzi *et al.* 2001; Steenland *et al.* 2004). Als Folge stieg die Tumorzinzidenz und Mortalität der dort lebenden Menschen (Bertazzi *et al.* 2001).

Der Abbau der HAH in der Umwelt erfolgt vorwiegend durch Photolyse (Atkinson *et al.* 1991). Aufgrund der zahlreichen Einflussgrößen ist die Halbwertszeit von TCDD sehr unterschiedlich. Die Halbwertszeit beträgt z.B. in Bodenpartikeln 10-12 Jahre. In Organismen ist diese vom Körpergewicht und Körperfettanteil abhängig und liegt bei Mäusen bei 8-24 Tagen und bei Meerschweinchen bei 30-94 Tagen. Im Menschen wird eine Halbwertszeit von 7 bis 10 Jahren angenommen (Geyer *et al.* 1986; Miniero *et al.* 2001). Als Hauptquelle der Aufnahme von PCDD und PCDF gilt die Nahrung (Parzefall *et al.* 2002). Betroffen sind vor allem tierische Lebensmittel wie Milch, Fleisch und Fisch, während pflanzliche Nahrungsmittel eine untergeordnete Rolle spielen (Fürst *et al.* 1998). Dioxine sind ebenfalls in der menschlichen Muttermilch zu finden (Eskenazi *et al.* 2004).

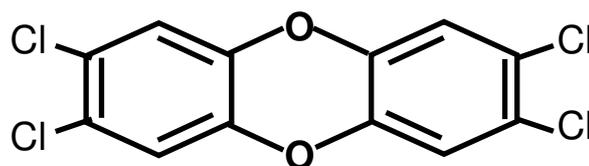


Abb. 1-5: Struktur des 2,3,7,8-Tetrachloro-dibenzo-*para*-dioxin (TCDD)

Zur Einschätzung der Toxizität für Menschen wurde das Toxizitätsäquivalent-System eingeführt. Dabei wurde das Kongener mit der höchsten Toxizität, das 2,3,7,8-TCDD, als Referenzsubstanz gewählt und dessen Toxizitätsäquivalenzfaktor (TEF) mit 1,0 festgelegt (Safe *et al.* 1998). Die Toxizität von TCDD wird in Abschnitt 1.4.5 näher beschrieben. Die WHO legte aufgrund der Toxizität von TCDD für dessen Aufnahme eine tolerierbare Grenze von 1-4 pg/kg/Tag fest (van Leeuwen *et al.* 2000).

Die HAH repräsentieren die potenteste Klasse der AhR-Liganden mit einer hohen Affinität für den AhR. Die Dissoziationskonstanten für Jod<sup>125</sup>-markiertes Dibromodibenzo-*p*-dioxin liegt bei 6 bis 10 pM (Bradfield *et al.* 1988; Schmidt *et al.* 1996).

Um die Liste der AhR-Liganden zu vervollständigen, müssen auch die natürlichen Liganden erwähnt werden. Dazu gehören sowohl in der Nahrung vorkommende als auch endogene Liganden, wie Indol und indolhaltige Verbindungen, die über verschiedene Reaktionen aus der Aminosäure Tryptophan gebildet werden können (Heath-Pagliuso *et al.* 1998). Andere AhR-Liganden sind z.B. die aus dem menschlichen Urin isolierten Verbindungen Indirubin und Indigo (Adachi *et al.* 2001), die Hämoglobin-Abbauprodukte Bilirubin und Biliverdin (Phelan *et al.* 1998) und der Arachidonsäuremetabolit Lipoxin A4 (Schaldach *et al.* 1999). Fast jährlich werden neue AhR-Liganden identifiziert, allerdings ist der bereits seit langem gesuchte, spezifische und höchst wirksame endogene Ligand des AhR bis heute noch nicht bekannt (Fujii-Kuriyama *et al.* 2005).

### 1.4.2 Die Struktur des AhR

Am N-Terminus des AhR befindet sich die basische Domäne, gefolgt von der HLH-Domäne. Beide sind in die Heterodimerisierung und DNA-Bindung involviert. An diese Domänen schließen sich die beiden PAS-Domänen A und B an, die für die Heterodimerisierung, Ligandenbindung und Hsp90-Bindung notwendig sind. Die Ligandenbindungsdomäne (LBD) des AhR ist in der Sequenz von As 230 bis As 421 lokalisiert und überlappt so mit der PAS-B-Region, die ebenfalls die Bindungsstelle für das Hsp90 enthält (Bacsi *et al.* 1996; Whitelaw *et al.* 1993) (siehe Abb. 1-6).

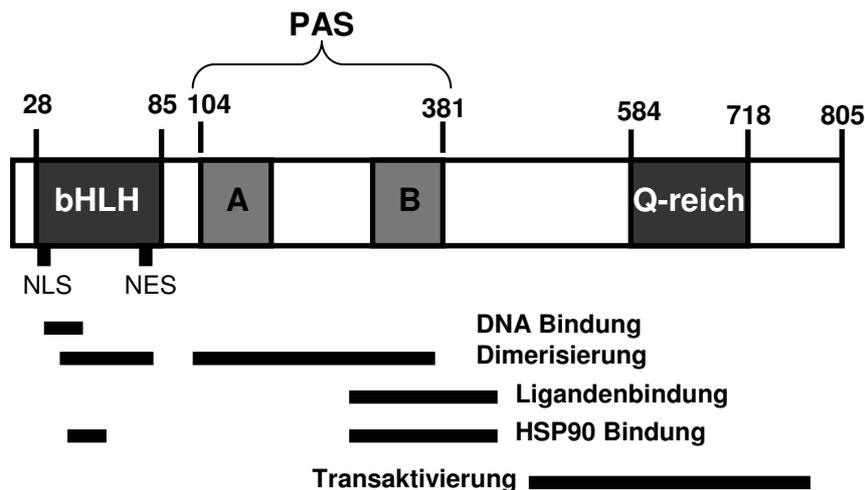


Abb. 1-6: Struktur des AhR

**bHLH**, *basic-helix-loop-helix*; **PAS**, Per/ARNT/SIM; **NLS**, Kernlokalisierungssignal; **NES**, Kernexportsignal

Für die Interaktion mit Hsp90 ist zusätzlich die bHLH-Domäne nötig, in der außerdem das Kernlokalisierungssignal (NLS, As 13-39) enthalten ist. In der bHLH-Domäne ist weiterhin ein Kernexportsignal (NES, As 55-75) lokalisiert (Ikuta *et al.* 1998). Die Transaktivierungsdomäne (As 521-640) des AhRs ist C-terminal gelegen und ermöglicht die Bindung von Ko-Faktoren, wie z.B. des Proteins p300 (Jain *et al.* 1994; Mimura *et al.* 2003).

### 1.4.3 Der AhR-Signalweg

Der AhR-Signalweg ist in Abbildung 1-7 dargestellt. Dieser wird im folgenden Abschnitt detailliert beschrieben, weil er für das Verständnis dieser Arbeit von wesentlicher Bedeutung ist. Der *de-novo* synthetisierte AhR bildet in Abwesenheit von Liganden im Zytoplasma mit dem Chaperon Hsp90, dem Ko-Chaperon p23 und dem Immunophilin-ähnlichen Protein XAP2 (Hepatitis B Virus X assoziiertes Protein, auch bekannt als AIP oder ARA9) einen stabilen Komplex. XAP2 bindet an die PAS-Domäne des AhR und die C-terminale Region des XAP2-Proteins interagiert mit Hsp90 (Meyer *et al.* 1999). XAP2 hat eine stabilisierende Funktion, wobei angenommen wird, dass das Protein auch als Ko-Aktivatoren wirken kann (Carver *et al.* 1997; Ma *et al.* 1997). Das Ko-Chaperon p23 bindet in diesem Komplex an die Nukleotidbindungsstelle im N-Terminus des Hsp90 und wird für eine effiziente Aktivierung des AhR-Signalweges benötigt (Cox *et al.* 2003; Kazlauskas *et al.* 1999). Hsp90 reprimiert die DNA-Bindungsaktivität des AhR und formt und hält die Ligandenbindungskonformation aufrecht (Pongratz *et al.* 1992; Whitelaw *et al.* 1994).

Die Liganden des AhR binden an die LBD und interagieren je nach Affinität mit unterschiedlichen Aminosäuren. Essentiell für die Ligandenbindung ist die Aminosäure Tryptophan 320 (Backlund *et al.* 2004; Goryo *et al.* 2007). Die Bindung von Liganden an den AhR führt zu

einer Konformationsänderung, wodurch über das NLS der Kernimport erfolgt und gleichzeitig die DNA-Bindungsaffinität erhöht wird (Bradfield *et al.* 1988; Henry *et al.* 2003). Ikuta *et al.* (Ikuta *et al.* 2004) beschrieben, dass Serin-Phosphorylierungen im NLS durch die Protein Kinase C den Kernimport negativ regulieren.

Im Kern konkurriert der Heterodimerisierungspartner ARNT mit Hsp90 um die Bindung an die HLH- und PAS-Domänen des AhR (Meyer *et al.* 1999). Es erfolgt die Dissoziation des Hsp90-XAP2-p23 Komplexes (McGuire *et al.* 1994). Der AhR/ARNT-Komplex kann über die Transaktivierungsdomäne Ko-Faktoren binden, die die transkriptionelle Aktivität des Komplexes erhöhen. Als Ko-Faktoren sind die aus der Familie der Kernrezeptoren als Ko-Aktivatoren bekannten Proteine SRC-1, NCoA-2, pCIP (Beischlag *et al.* 2002) und das Protein RIP140 (Mimura *et al.* 2003) zu nennen. Zusätzlich kann ARNT mit der Histonacetyltransferase p300 interagieren (Kobayashi *et al.* 1997). Die Bindung der Ko-Faktoren ermöglicht außerdem die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktorkomplexen (Carlson *et al.* 2002). Der AhR/ARNT-Komplex ist ein aktiver Transkriptionsfaktorkomplex, der an das AhR-spezifische *Response*-Element XRE (xenobiotische *Response*-Element) in der Promoterregion der Zielgene bindet. Die Erkennung der DNA-Bindungsstelle wird durch die basische Domäne des AhR vermittelt (Bacsi *et al.* 1995; Fukunaga *et al.* 1995; Swanson *et al.* 1995). Die Aminosäure Lysin 11 ist essentiell für die DNA-Bindung (Andreasen *et al.* 2002). Die Kernsequenz des XRE ist 5'-CACGC-3' (Denison *et al.* 1988).

Seit langem bekannte Zielgene des AhR sind das Cytochrom P450 1A1 (Cyp1A1) (Jones *et al.* 1990), die UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) (Yueh *et al.* 2003) und die Glutathion S-Transferase Ya (GST Ya) (Paulson *et al.* 1990), sowie Gene, die für Enzyme zur Detoxifikation von Xenobiotica kodieren (Jakoby *et al.* 1990). Ein weiteres Zielgen ist der AhR-Repressor (AhRR) (Baba *et al.* 2001; Karchner *et al.* 2002; Tsuchiya *et al.* 2003). Dieser negative Regulator des AhR-Signalweges gehört ebenfalls zu Familie der bHLH/PAS-Proteine und ähnelt strukturell dem AhR. Zwischen beiden Proteinen besteht eine große Homologie vom N-Terminus bis zur PAS-A-Domäne. Der AhRR besitzt allerdings keine PAS-B- und TAD-Domäne (Kewley *et al.* 2004). Dieser Faktor konkurriert mit dem AhR um die Bindung von ARNT und kann ebenfalls an das XRE binden. Es wird angenommen, dass dieses Protein durch diese Konkurrenz den AhR-Signalweg blockiert und die AhR-vermittelte Induktion der Zielgene vermindert (Baba *et al.* 2001; Karchner *et al.* 2002; Mimura *et al.* 1999). Der AhRR wird konstitutiv exprimiert (Bernshausen *et al.* 2005; Tsuchiya *et al.* 2003) und im AhRR-Promotor ist eine XRE-Bindestelle lokalisiert (Baba *et al.* 2001).

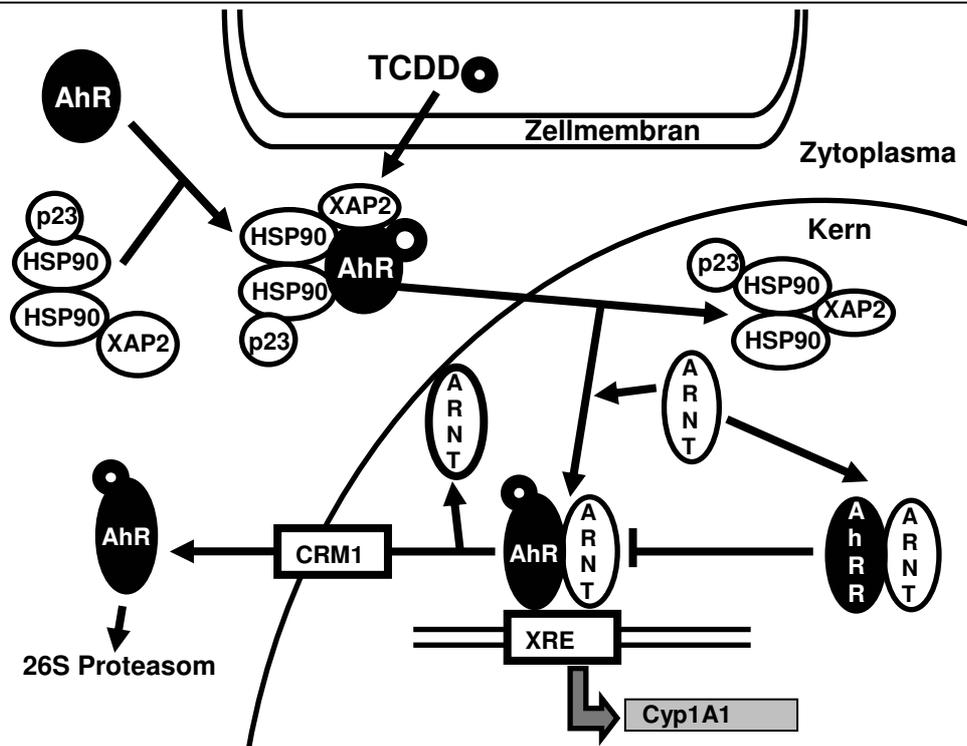


Abb. 1-7: Der AhR-Signalweg

Die Bindung von TCDD an den AhR führt zur Kerntranslokation sowie anschließender Heterodimerisierung des Transkriptionsfaktors mit ARNT. Dieser Komplex induziert die Transkription der Zielgene. Die Bindung des AhR/ARNT-Komplexes an das XRE wird durch den AhR-Repressor/ARNT-Komplex inhibiert.

Der Kernexport des AhR wird durch den Faktor CRM1 (*chromatin region maintenance 1*) vermittelt. Sowohl der latente AhR/Hsp90-Komplex als auch der aktivierte AhR werden exportiert. Das Protein CRM1 interagiert mit dem NES des AhR. Die Dimerisierung des AhR mit ARNT verhindert das Erkennen des NES. Nach dem Kernexport erfolgt der Abbau des AhR durch das 26S Proteasom (Davarinos *et al.* 1999; Song *et al.* 2002).

#### 1.4.4 Die Interferenz zwischen dem AhR- und dem Östrogen-Rezeptor $\alpha$ - (ER $\alpha$ ) Signalweg

Ein weiteres wichtiges Anliegen der vorliegenden Arbeit ist die Wechselwirkung des AhR- und ER $\alpha$ -Signalweges. Die molekularen und zellulären Wirkungen des Steroidhormons 17 $\beta$ -Östradiol werden durch den Östrogen-Rezeptor (ER) vermittelt. Zwei ER-Isoformen sind bekannt: ER $\alpha$  und ER $\beta$ . Beide ER bestehen aus 6 Regionen. Die Regionen A und B haben eine konstitutiv aktive Transkriptionsfunktion (AF1, *activating function 1*). Region C wird für die DNA-Bindung benötigt und Region D enthält eine NLS. Die Regionen E und F enthalten die Ligandenbindungsdomäne und die AF2, welche eine Liganden-aktivierte Transkriptionsfunktion beinhaltet (Ikeda *et al.* 2004). Die Hormonbindung induziert eine Konformations-

änderung, wodurch der ER homodimerisiert, in den Kern transloziert und an das ER-spezifische *Response-Element* (ERE, 5'-AGGTCA-3') bindet (Hall *et al.* 2001). Die ER können durch die Phosphorylierung am Serin 106, 118, 167 und 236 und Tyrosin 537 transaktiviert werden. Die Phosphorylierungen werden durch den PI3K-, den Akt-, den MAPK-Signalweg oder durch die Protein Kinase A vermittelt, wodurch die ER-Aktivität erhöht wird (Pearce *et al.* 2004).

Es besteht eine inhibitorische Wechselwirkung zwischen dem AhR- und dem ER $\alpha$ -Signalweg, die durch verschiedene Mechanismen vermittelt wird. So kann eine direkte Inhibierung des ER $\alpha$ -Signalwegs über den aktivierten AhR/ARNT-Komplexes durch dessen Bindung an das inhibitorische XRE (iXRE) im Promotorbereich von Zielgenen des ERs erfolgen. Ein iXRE ist z.B. in den durch Östrogen induzierbaren Genen Cathepsin D, pS2 und cFos zu finden (Safe *et al.* 2000). Die Bindung des AhR/ARNT-Komplexes an ein iXRE im Promoter verhindert die Bildung eines transkriptionell aktiven ER-SP1-Komplexes (Duan *et al.* 1999; Wang *et al.* 2001). Die Interaktion des aktivierten AhR/ARNT-Komplexes mit AP1 (*activating protein 1*) am XRE/AP1-DNA-Bindemotiv verhindert die Bindung des aktivierten ER $\alpha$  an das benachbarte ERE (Gillesby *et al.* 1997). Außerdem entsteht ein weiterer inhibitorischer Mechanismus durch die Konkurrenz um Ko-Aktivatoren. Der AhR und der ER $\alpha$  konkurrieren um den Ko-Faktor NF1 (*nuclear factor 1*), wodurch die AhR-induzierte Transkription des Cyp1A1 reduziert wird (Ricci *et al.* 1999). Weiterhin kommt die Synthese eines bisher unbekanntem inhibitorischen Proteins zur Vermittlung der inhibitorischen Interferenz in Frage (Matthews *et al.* 2006). Ebenfalls ist eine direkte Bindung des ER $\alpha$  an den AhR möglich. Die AF1-Domäne des ER $\alpha$  wird für die Interaktion mit dem aktivierten AhR benötigt und wird als weiterer Mechanismus zur Kontrolle der ER $\alpha$ -Proteinmenge beschrieben (Ohtake *et al.* 2003). Ein erhöhter proteosomaler Abbau des ER $\alpha$  und des AhR durch die Aktivierung des AhR ist ein weiterer inhibitorischer Mechanismus (Wormke *et al.* 2003). Schließlich kann eine Veränderung in der Östrogensynthese bzw. des Östrogen-metabolismus durch eine erhöhte Expression der drei Enzyme Aromatase, Cyp1A1 oder Cyp1A2 hervorgerufen werden. Cyp1A1 oder Cyp1A2 führen zu einer Erhöhung des oxidativen Östrogenmetabolismus und zu einer Verringerung des Östrogens (Spink *et al.* 1992; Spink *et al.* 1994; Spink *et al.* 1990).

#### **1.4.5 TCDD- (AhR-vermittelte) induzierte zelluläre Antwort**

TCDD, der potenteste AhR-Ligand, löst ein breites Spektrum an biochemischen und toxischen Effekten aus, z.B. akute Toxizität, Entwicklungs- und Reproduktionstoxizität, Neurotoxizität, Immuntoxizität, endokrine Störungen sowie Kanzerogenität. Auftreten und

Stärke dieser Toxizitäten unterscheiden sich nach Spezies, Geschlecht und Alter (Birnbaum *et al.* 2000; Mandal *et al.* 2005).

Hinsichtlich der akuten Toxizität gibt es inter- und intraspezifische Unterschiede. Der LD<sub>50</sub>-Wert liegt z.B. beim Meerschwein bei 2 µg/kg Körpergewicht beim Hamster dagegen bei 3000 µg/kg Körpergewicht (McConnell *et al.* 1978; Olson *et al.* 1980). Besonders deutlich werden intraspezifische Unterschiede am Beispiel verschiedener Rattenstämme. Long-Evans Ratten haben einen LD<sub>50</sub>-Wert von 18 µg/kg Körpergewicht, wohin-gegen Han/Wistar Ratten einen LD<sub>50</sub>-Wert von 9600 µg/kg Körpergewicht aufweisen (Pohjanvirta *et al.* 1999; Unkila *et al.* 1995). Charakteristisch für die toxische Wirkung des TCDD ist das „wasting“ Syndrom vor Eintritt des Todes. Dieses Auszehrsyndrom wird durch eine dramatischen Reduktion des Körpergewichtes, hauptsächlich durch Verlust von Fett- und Muskelgewebe charakterisiert (Kelling *et al.* 1985).

In der Reproduktion und der Entwicklung wirkt sich TCDD auf die Morphologie und Funktion der Reproduktionsorgane aus (Gray *et al.* 1996; Pocar *et al.* 2005). Eine konstitutive Stimulation des AhR sowie eine konstitutive Cyp1A1-Expression scheint während der Oozytenreifung nötig zu sein (Nestler *et al.* 2007; Pocar *et al.* 2004). Im Erwachsenenalter kann eine verringerte Spermatogenese beobachtet werden (Mably *et al.* 1992a; Mably *et al.* 1992b). Im frühen Entwicklungsstadium kann eine Exposition mit TCDD beim Embryo zu strukturellen Missbildungen und Totgeburten führen, weshalb TCDD als ein Teratogen eingestuft wurde (Courtney *et al.* 1971; Huuskonen *et al.* 1994). Eine pränatale Exposition mit TCDD erhöht das Brustkrebsrisiko im Erwachsenenalter (Jenkins *et al.* 2006). Weiterhin stört TCDD das endokrine System, so beispielsweise Signalwege der Schilddrüsen- und Steroidhormone (Potter *et al.* 1983; Schuur *et al.* 1997) (siehe Abschnitt 1.4.4).

Den empfindlichsten Angriffspunkt für TCDD stellt das Immunsystem dar. Dies äußert sich primär im Verlust an lymphatischen Gewebe insbesondere im Thymus (Vos *et al.* 1974). In Versuchstieren wird die Antikörperproduktion, die B-Zell-Reifung und die T-Zell-Aktivierung durch TCDD-Exposition negativ beeinflusst (Inouye *et al.* 2003; Kerkvliet *et al.* 2002; Sulentic *et al.* 2000; Thurmond *et al.* 2000). Auch sind störende Effekte auf die synaptische Übertragung und die neuronale Netzbildung bekannt (Mandal *et al.* 2005).

Besonders hervorzuheben ist, dass TCDD ein Karzinogen ist, wobei diese Substanz weder genotoxisch noch mutagen wirkt. TCDD fördert die Entstehung verschiedener Arten von Tumoren in Versuchstieren wie Mäuse, Ratten, Hamster (IARC *et al.* 1997). Dies wurde auch besonders nach dem Unfall in Seveso deutlich, nachdem die Tumorbildung der dort lebenden Menschen signifikant stieg (Bertazzi *et al.* 2001). Auf zellulärer Ebene sind Differenzierungs- und Proliferationsvorgänge fehlgesteuert. Nach TCDD-Exposition kann eine Inhibierung der

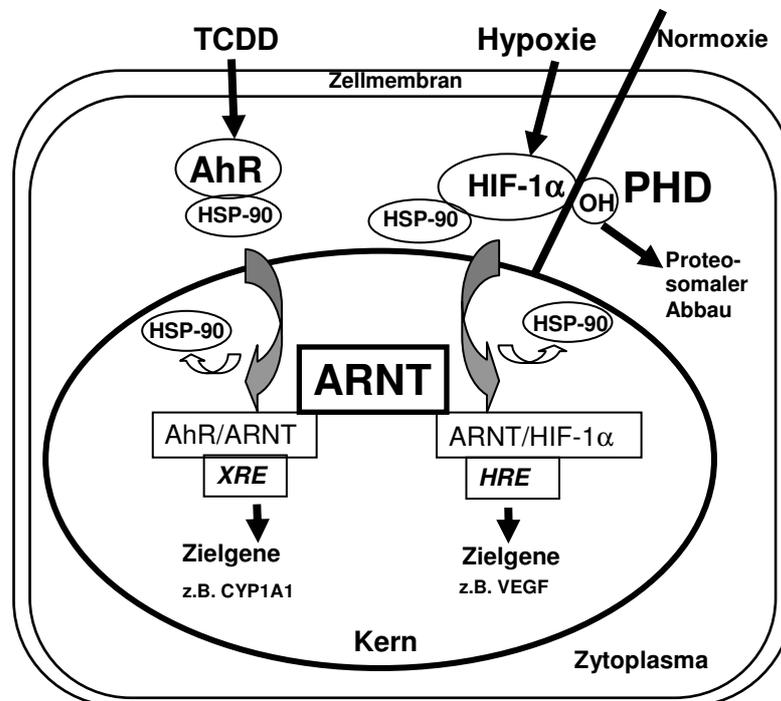
Proliferation bzw. ein G1-Phasenarrest (Biegel *et al.* 1990; Marlowe *et al.* 2004) und eine Inhibierung der Zelldifferenzierung (Vogel *et al.* 2003) beobachtet werden.

### **1.5 Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -Signalweg**

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -Signalweg. Der lipophile Umweltschadstoff TCDD akkumuliert im Fettgewebe, z.B. in der Brustdrüse (Abraham *et al.* 1996). Sowohl das TCDD als auch Hypoxie, die durch ungenügende Vaskularisierung entsteht, können molekulare Mechanismen im Mammakarzinom beeinflussen. Die durch TCDD- und Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktoren AhR und HIF-1 $\alpha$  heterodimerisieren beide mit ARNT und binden an das spezifische *Response-Elemente* im Promotorbereich verschiedener Zielgene. Das XRE (5'-CACGC-3') und das HRE (5'-CACGTA-3') haben die Sequenz 5'-CAC-3' gemeinsam. Diese Sequenz der *Response-Elemente* wird spezifisch durch ARNT erkannt. Das XRE wird im Vergleich zum HRE stärker durch ARNT gebunden (Kinoshita *et al.* 2004). Lee und Koautoren (Lee *et al.* 2006) haben die differentielle Genexpression nach gleichzeitiger Exposition mit TCDD und Hypoxie in der menschlichen Hepatom-Zelllinie Hep3B untersucht und Unterschiede zur Genexpression nach Einzelexposition gefunden. Zu den differentiell reguliert Genen nach gleichzeitiger Exposition zählen die klassischen Zielgene Cyp1A1 und die Karbonanhydrase IX sowie Gene, die in den Lipidmetabolismus involviert sind.

Die Interferenz zwischen dem AhR- und HIF-1 $\alpha$ -Signalweg (siehe Abb. 1-8) wurde bereits untersucht. Chan und Koautoren (Chan *et al.* 1999) konnte zeigen, dass eine gleichzeitige Stimulation mit CoCl<sub>2</sub> (einem HIF-1 $\alpha$ -Stabilisator) und  $\beta$ -Naphthoflavon (einem AhR-Agonisten) die Induktion des XRE und HRE sowie die Induktion der Zielgene EPO und Cyp1A1 in der humanen Hepatom-Zelllinie Hep3B inhibiert. Andere Gruppen konnten dagegen nur eine Inhibierung des AhR-Signalweges durch Hypoxie in einer humanen (HepG2), einer Ratten- (H4IIE) und murinen (Hepa1) Hepatom-Zelllinien beobachten (Gassmann *et al.* 1997; Gradin *et al.* 1996; Kim *et al.* 2000; Park *et al.* 1999; Pollenz *et al.* 1999). *In vivo*-Studien in Ratten zeigten, dass durch orale Applikation von TCDD und Exposition mit Kohlenmonoxid die AhR-vermittelte Induktion des Zielgenes Cyp1A1 inhibiert ist, allerdings die HIF-1 $\alpha$ -vermittelte Induktion des Zielgenes VEGF unverändert blieb (Hofer *et al.* 2004). Dagegen wurde eine Reduktion des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges durch die Aktivierung des AhR-Signalweges im Zebrafisch und in der murinen Hepatom-Zelllinie Hepa1 (Nie *et al.* 2001; Prasch *et al.* 2004) beschrieben. Diese

Daten zeigen, dass die Interferenz zwischen dem AhR- und HIF-1 $\alpha$ -Signalweg von der Sensitivität der Zelllinie gegenüber den einzelnen Stressoren sowie von der eingesetzten Konzentration der Stressoren abhängig ist.



**Abb. 1-8: Die Interferenz zwischen dem AhR- und HIF-1 $\alpha$ -Signalweg**  
 Hypoxie bzw. die Bindung von TCDD führen zur Aktivierung und Kerntranslokation der Transkriptionsfaktoren HIF-1 $\alpha$  bzw. AhR. Nach anschließender Heterodimerisierung mit ARNT und Bindung der Komplexe an die *Response*-Elemente (HRE/XRE) in der Promoterregion wird die Transkription der Zielgene induziert.

Anfangs wurde eine Konkurrenz der Transkriptionsfaktoren AhR und HIF-1 $\alpha$  um den gemeinsamen Dimerisierungspartner ARNT angenommen (Gradin *et al.* 1996; Park *et al.* 1999). Allerdings zeigten *Gel mobility shift*- und Western Blot-Analysen, dass dieselbe Menge an AhR/ARNT-Komplexen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen gebildet wird (Pollenz *et al.* 1999). Weiterhin konnte durch *Knockout*-Analysen gezeigt werden, dass eine Verringerung von ARNT nicht zur Destabilisierung von HIF-1 $\alpha$  oder zur Inhibierung des AhR-Signalweges führt (Tomita *et al.* 2000). Somit blieb die Frage nach dem Mediator der Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -Signalweg bisher unbeantwortet.

---

## 1.6 Zielstellung

Vor dem Beginn dieser Arbeit war bereits die Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -Signalweg in Mäusen, Ratten und humanen Hepatom-Zelllinien untersucht worden. Außerdem war die anti-östrogene Wirkung des TCDD, die inhibitorische Wechselwirkung zwischen dem AhR- und ER $\alpha$ -Signalweg und zwischen dem HIF-1 $\alpha$ - und p53-Signalweg in Versuchstieren und Zelllinien beschrieben. Die Auswirkungen der Interferenz zwischen dem AhR- und HIF-1 $\alpha$ -Signalweg auf andere Signalwege waren allerdings noch unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die humane ER-positive Brustkrebszelllinie MCF-7 als Zellmodell gewählt. In diesen Zellen wurden der AhR- und der HIF-1 $\alpha$ -Signalweg einzeln und nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie untersucht. Die Zelllinie MCF-7 ist ein häufig verwendetes Zellmodell, um Effekte von Östrogenen und Anti-Östrogenen auf Genexpression und Proliferation zu untersuchen. Im Vergleich zu den bisher in anderen Studien verwendeten Zellmodellen bieten MCF-7-Zellen den Vorteil, die Auswirkungen einer physiologisch relevanten Exposition mit TCDD und Hypoxie in einer Hormon-abhängigen Zelllinie untersuchen zu können. Es wurden Veränderungen im ER $\alpha$ - sowie p53-Signalweg nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie analysiert und mit bereits in der Literatur beschriebenen Effekten der Einzelstimulation verglichen.

Ein weiterer Ausgangspunkt dieser Arbeit waren Mikroarray-Daten, die den Transkriptionsfaktor NFAT als TCDD- und Hypoxie-reguliertes Gen identifiziert hatten. Die Aktivierung des NFAT-Signalweges nach Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie wurde deshalb untersucht. Schließlich wurden zur weiteren Charakterisierung der Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -Signalweg verschiedene Proteine untersucht, die in der Literatur als Interaktionspartner von HIF-1 $\alpha$  beschrieben wurden.

## 2 Material und Methoden

Die meisten Reagenzien wurden von der Firma SIGMA-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Sofern dies nicht zutrifft, wird im Folgenden der Firmenname in Klammern genannt. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist im Anhang B Abschnitt 8.1 aufgeführt.

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Kultivierte Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die Zelllinien MCF-7 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen, Braunschweig) und HepG2 (Prof. D. M. Katschinski, Zentrum Physiologie und Pathophysiologie, Abteilung Herz- und Kreislaufphysiologie, Georg-August-Universität Göttingen) verwendet. Die MCF-7- (Michigan Cancer Foundation) Zelllinie ist eine humane, hormonsensitive Mammakarzinomzelllinie, die 1970 aus dem Pleuraerguss einer Patientin isoliert wurde, deren metastasiertes, duktales Mammaadenokarzinom zuvor drei Jahre lang mit Hormon- und Radiotherapie behandelt worden war. Diese Zelllinie wurde in verschiedenen Studien (Katzenellenbogen *et al.* 1987; Pink *et al.* 1996) verwendet, um Östrogen-abhängige Prozesse sowie die Auswirkungen von Anti-Östrogenen im Brustkrebs zu untersuchen. Die Zelllinie HepG2 wurde aus einem Patienten mit hepatozellulären Karzinom isoliert und etabliert (Knowles *et al.* 1980). Diese Zelllinie ist ein häufig verwendetes Zellmodell, um Hypoxie und den Einfluss von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren auf den HIF-1 $\alpha$ -Signalweg zu untersuchen (Stiehl *et al.* 2002; Tacchini *et al.* 2001).

#### 2.1.2 Kultur und Stimulation der Zelllinien

MCF-7-Zellen wurden in MEM Earle (*Minimal essential medium*, Biochrom, Berlin), ergänzt mit 10 % FBS (*fetal bovine serum*, Biochrom) sowie 1 mM Natriumpyruvat (Biochrom) und 4  $\mu$ g/ml Rinderinsulin bei 37 °C, 20 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>, kultiviert. HepG2-Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, Gibco, Karlsruhe), versetzt mit 10 % FBS, 1 mM Natriumpyruvat bei 37 °C, 20 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>, kultiviert. Je nach Konfluenz wurden die Zellen nach 2 bis 3 Tagen passagiert. Dafür wurde das Kulturmedium verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 0,05 % Trypsin/PBSE abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden im entsprechenden Kulturmedium aufgenommen und auf mehrere Zellkulturflaschen verteilt.

Zur Stimulation mit 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) und/oder Hypoxie wurden die Zellen mit einer definierten Zellzahl ausplattiert und für 24 Stunden bei 37 °C, 20 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> (normoxische Bedingungen) kultiviert. Die Exposition mit TCDD (Amchro, Hattersheim) erfolgte mit einer Endkonzentration von 0,01 nM bis 100 nM. Um Effekte des

Lösungsmittels für TCDD auszuschließen, wurde zusätzlich zu jeder TCDD-Exposition eine DMSO-Kontrolle mitgeführt. Die Konzentration des DMSO in den Kontrollen entsprach der DMSO-Konzentration in den TCDD-Stimulationen. Vor einer hypoxischen Stimulation wurde das Kulturmedium 12 h bei 37 °C, 5 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> äquilibriert und danach den Zellen zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen je nach Fragestellung für 6 h bis 24 h in einer hypoxischen Kammer bei 37 °C, 5 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei Doppelsexposition mit TCDD und Hypoxie erfolgte die Stimulation mit 10 nM TCDD unter den beschriebenen hypoxischen Bedingungen. Die Dauer der Stimulation variierte in Abhängigkeit unterschiedlicher Fragestellungen von 1 h bis 6 h bzw. 24 h. In der folgenden Tabelle sind die zusätzlich verwendeten Zusätze aufgeführt.

**Tabelle 2-1: Verwendete Zusätze zur Zellkultur**

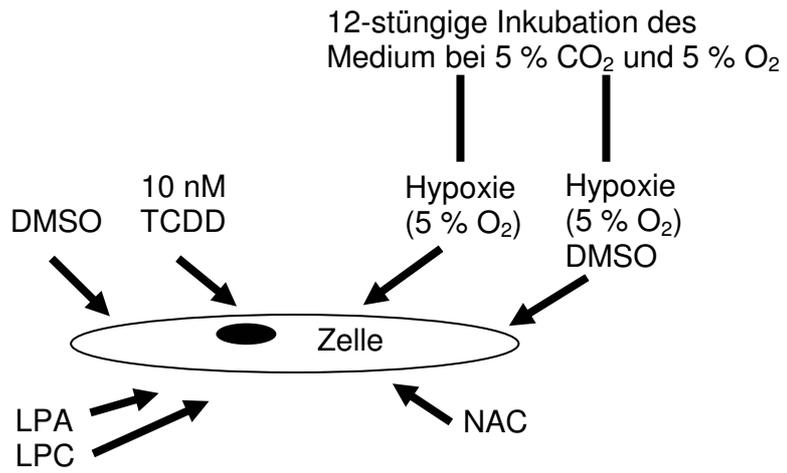
<b>Zusatz</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Lösungsmittel</b>	<b>Beschreibung / Wirkung</b>
α-Naphthoflavon (ANF)	10 µM	DMSO	AhR Antagonist
Cyclosporin A (CsA)	1 µM	50 % Ethanol	Inhibitor des Kalzineurin
PD98059	50 µM	DMSO	Inhibitor der MEK1
NAC (N-acetylcystein)	1 mM	ddH <sub>2</sub> O	Radikalfänger
LPC (Lysophosphatidylcholin)	10 mM	ddH <sub>2</sub> O	Substrat des Autotaxin
LPA (Lysophosphatidylsäure)	10 mM	ddH <sub>2</sub> O	Produkt der Autotaxin- vermittelten Hydrolyse von LPC

Zur Illustration sind in Abb. 2-1 die allgemeingültigen Stimulationsschemata aufgeführt.

**1. Stimulationsschema:**

**Vorinkubation  
des Mediums**

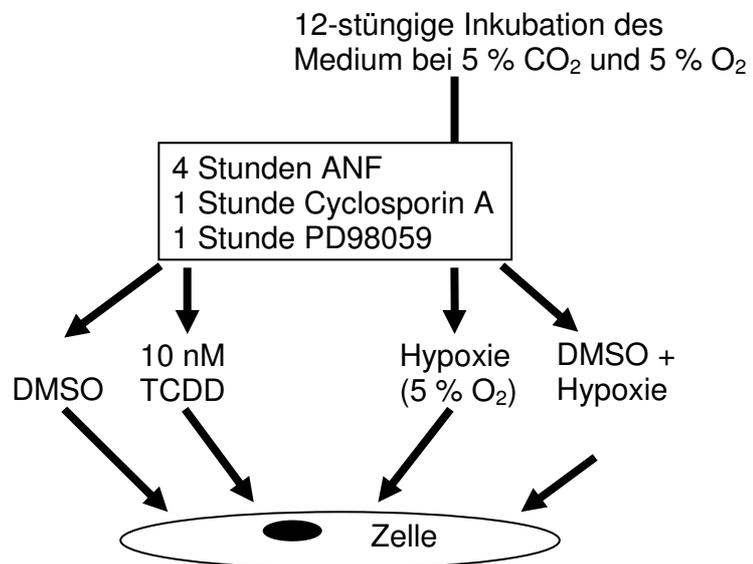
**6-stündige bzw.  
24-stündige  
Stimulation der  
Zellen und/bzw.  
Inkubation mit  
verschiedenen  
Zusätzen**

**2. Stimulationsschema:**

**Vorinkubation  
des Mediums**

**Vorinkubation der  
Zellen mit Inhibitoren**

**1- bis 6-stündige  
bzw. 24-stündige  
Stimulation der  
Zellen**



**Abb. 2-1: Stimulationsschemata**

Die Zugabe der in Tabelle 2-1 aufgeführten Zusätze erfolgte entweder allein, simultan während der Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie (1. Stimulationsschema) oder vor der Inkubation mit TCDD und/oder Hypoxie (2. Stimulationsschema).

**2.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen**

Die im flüssigem Stickstoff bei  $-196\text{ °C}$  gelagerten Zellen wurden bei  $37\text{ °C}$  aufgetaut, in ein 15 ml Reaktionsröhrchen mit dem entsprechenden Kulturmedium überführt und bei  $1000 \times g$  und  $4\text{ °C}$ , 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet im vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt.

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese (wie im Abschnitt 2.1.2 beschrieben) mit Trypsin abgelöst, in dem entsprechenden Kulturmedium aufgenommen und 5 Minuten bei  $1000 \times g$  und  $4\text{ °C}$  zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Medium (10 % DMSO und 20 % FBS) resuspendiert und in ein Kryo-Röhrchen überführt. Das Kryo-Röhrchen wurde in einem mit

Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter (Kühlungsrate von  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$ ) auf  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und anschließend im flüssigen Stickstoff gelagert.

#### 2.1.4 Durchflußzytometrie

Die durchflusszytometrischen Messungen der Zellen erfolgten mit dem FACSCAN (BD Bioscience, Heidelberg). Von jeder Zelle wurden das Vorwärtsstreulicht (FSC) und das Seitwärtsstreulicht (SSC) gemessen, aus denen Informationen zur Zellgröße bzw. Zellgranularität gewonnen werden können. Die Auswertung erfolgte mit der CellQuestPRO-Software (BD Bioscience). Dabei wurden im Diagramm „FSC gegen SSC“ die vitalen Zellen selektiert. Die Bildung von intrazellulären reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wurde mit Hilfe des Detektionsreagenz 2',7'-Dichlorofluoreszeindiacetat ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , Invitrogen, Karlsruhe) gemessen. ROS in den Zellen bedingt die Oxidation des nichtfluoreszierenden Reagenz  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  zum fluoreszierenden Produkt 2',7'-Dichlorofluoreszein (DCF). Nach der Stimulation wurden die abgelösten Zellen (wie im Abschnitt 2.1.2 beschrieben) mit  $10\text{ }\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCFDA}$  20 Minuten inkubiert, 5 min bei  $1000\text{ x g}$  zentrifugiert und das Zellpellet mit PBS resuspendiert. Das fluoreszierende Produkt DCF wurde mit der Wellenlänge von  $495\text{ nm}$  angeregt. Die Emissionswellenlänge des Produkts liegt bei  $527\text{ nm}$ . Die Fluoreszenzintensität wurde von  $50000$  Zellen bestimmt. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen.

#### 2.1.5 Migrationstest

Der Migrationstest dient zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von Zellen durch  $12\text{ }\mu\text{m}$ -große Poren einer Transwellkammer (Costar, Bodenheim) mit einer Transwell-Polycarbonat-Membran (Membranstärke  $10\text{ }\mu\text{m}$ , Membrangröße  $0,33\text{ cm}^2$ ). Für den Migrationstest wurden in jede Kammer der 12 Well-Platte  $1,3\text{ }\mu\text{l}$  Collagen Typ I ( $3,5\text{ mg/ml}$ , BD Bioscience) und  $600\text{ }\mu\text{l}$  Medium pipettiert. Danach wurden die Transwellkammern eingesetzt,  $2\text{ x }10^5$  Zellen auf die Membran in  $300\text{ }\mu\text{l}$  Medium eingesät und die Zellen, wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben, stimuliert. Nach 24-stündiger Inkubation bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden die Zellen auf der oberen Seite der Membran mit einem Wattestäbchen entfernt. Die Zellen auf der unteren Seite der Membran wurden mit dem *CellTiter-Glo*® Chemilumineszenz Zellvitalitätstest (Promega, Mannheim) nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen durch Zugabe von  $200\text{ }\mu\text{l}$  *Cell-Titer-Glo*-Lösung (1:2 mit PBS verdünnt) und 2-minütigem Schütteln lysiert. Das Lysat wurde 10 Minuten bei RT inkubiert und anschließend die Lumineszenz im Sirius Luminometer (Berthold Detektion System, Pforzheim) gemessen (2 Sekunden Verzögerung, 10 Sekunden Messung). Die Ergebnisse wurden auf die Zellzahlkontrolle ( $2\text{ x }10^5$  Zellen) normiert.

## 2.2 Transfektion

Transfektion ist ein Prozess, in dem exogene Nukleinsäuren in eine eukaryotische Zelle durch biochemische oder physikalische Methoden eingebracht werden. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden verwendet: die Transfektion mit kationischen Lipiden und die Calciumphosphat-Kopräzipitation.

### 2.2.1 Transfektion mit kationischen Lipiden

Bei dieser Methode wird eine Kombination von kationischen Lipiden und ungeladenen Helferlipiden zur Transfektion verwendet. Die kationischen Liposomen akkumulieren spontan mit den Nukleinsäuren und bilden unilamellare Vesikel. Diese Vesikel fusionieren mit der Zellmembran und gelangen durch Endozytose in die Zellen (Felgner *et al.* 1987; Felgner *et al.* 1989). Die Bildung der Nukleinsäuren/Lipid-Komplexe wird durch ionische Wechselwirkung zwischen der positiv-geladenen Kopfgruppe der Lipide und der negativ-geladenen Phosphatgruppe der Nukleinsäuren vermittelt. Für die Transfektion ist das Verhältnis zwischen Lipid und DNA entscheidend, wobei die Lipide im Überschuß zur DNA eingesetzt werden sollten.

#### 2.2.1.1 Transfektion von exogener DNA

Nach dem folgenden Protokoll wurden die in der Tabelle 2-2 aufgeführten Vektoren in HepG2- und MCF-7-Zellen transfiziert. Es wurden jeweils  $5 \times 10^3$  Zellen in ein Well einer 24-Well-Zellkulturplatten oder  $1 \times 10^5$  Zellen in ein Well einer 6-Well-Zellkulturplatte in das entsprechende Kulturmedium für MCF-7- oder HepG2-Zellen eingesät und 24 Stunden kultiviert. Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium verworfen und durch das entsprechende Medium ohne FBS für MCF-7- oder HepG2-Zellen ersetzt. Zur Transfektion wurden das polykationische Transfektionsreagenz *Metafectene* (Biontex, Martinsried) verwendet.

Transfektionsansatz:

- 1,5 µg Vektor-DNA (24 Well-Zellkulturplatte)
- 10 µg Vektor-DNA (6 Well-Zellkulturplatte)
- 0,08 µg pRLSV40 (Promega)
- x µl *Metafectene* (*Metafectene* : DNA = 3:1)
- 100 µl serumfreies Medium

In Tabelle 2-2 sind die verwendeten Vektoren aufgeführt. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT wurden 100 µl Transfektionsansatz je Well den MCF-7 oder HepG2-Zellen zugesetzt und 6 Stunden bei 37 °C, 20 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium entfernt und durch frisches, FBS-haltiges Kulturmedium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen, wie im Abschnitt 2.1.2 beschrieben, stimuliert.

**Tabelle 2-2: Verwendete Vektoren zur Transfektion mit kationischen Lipiden**  
(zusätzliche Informationen siehe Anhang Abschnitt 8.4)

Vektoren	Promoterelement / kodiertes Gen
pp53-Luc Vektor	p53 <i>Response</i> -Element
pTAL-Luc/ERE	Östrogen-Rezeptor <i>Response</i> -Element
pH3SVL	Hypoxie <i>Response</i> -Element
pTAL-Luc/DRE	Dioxin <i>Response</i> -Element
pGL3b(1454-3164)P2P-wt	WT Promotor des Prolylhydroxylase 2
pGL3b(1454-3164)P2P-mt	MT Promotor der Prolylhydroxylase 2
pNFAT-Luc	NFAT <i>Response</i> -Element
pHSE-Luc Vektor	Hitzeschock <i>Response</i> -Element
pRL-SV40	Renilla Luziferase

### 2.2.1.2 Transfektion von siRNA

RNA-Interferenz stellt einen ursprünglichen Teil des Immunsystems dar, der Pflanzen und Tiere gegen Pathogene durch sequenzspezifischen Abbau der viralen RNA über *small interfering RNAs* (siRNA) schützt. Die posttranskriptionale Unterdrückung der Genexpression durch RNA-Interferenz wurde erstmals 1998 in Nematoden, *C. elegans* (Fire *et al.* 1998) beschrieben. Der siRNA-Ansatz ist eine Methode zur Unterdrückung der Genexpression, wobei die Ziel-RNA sequenzspezifisch erkannt und abgebaut werden kann. Der komplette Mechanismus zur Unterdrückung der Genexpression ist noch nicht vollständig aufgeklärt. In Abschnitt 8.4 wird der generelle Mechanismus der RNA-Interferenz erläutert.

Es wurden jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen in ein Well einer 6 Well-Zellkulturplatte oder  $1 \times 10^6$  Zellen in ein  $25 \text{ cm}^2$  Zellkulturgefäß in das entsprechende Kulturmedium für MCF-7-Zellen eingesät und 24 Stunden kultiviert. Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium verworfen und durch das entsprechende Medium ohne FBS für MCF-7-Zellen ersetzt. Zur Transfektion wurden das polykationische Transfektionsreagenz *Metafectene* (Biontex) verwendet.

Transfektionsansatz:

- 100 ng siRNA (6 Well-Zellkulturplatte)
- 250 ng siRNA ( $25 \text{ cm}^2$  Zellkulturgefäß)
- x  $\mu\text{l}$  *Metafectene* (*Metafectene*:siRNA = 3:1)
- 100  $\mu\text{l}$  serumfreies Kulturmedium

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten siRNAs aufgeführt. Die GFP-siRNA diente als Kontroll-siRNA, um unspezifische Effekte der siRNA Transfektion auszuschließen.

**Tabelle 2-3: Verwendete siRNA zur Transfektion mit kationischen Lipiden**  
(zusätzliche Informationen siehe Anhang Abschnitt 8.4)

Vektoren/siRNA	reprimiertes Gen
Dusp5-siRNA	Dual spezifische Phosphatase 5
RACK1-siRNA	Rezeptor der aktivierten Protein Kinase C
GFP-siRNA	GFP, nicht-spezifische siRNA

Nach 20-minütiger Inkubation bei RT wurden 100 µl Transfektionsansatz je Well den MCF-7-Zellen zugesetzt und 6 Stunden bei 37 °C, 20 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium entfernt und durch frisches, FBS-haltiges Kulturmedium ersetzt. Anschließend wurden die MCF-7-Zellen, wie im Abschnitt 2.1.2 beschrieben, stimuliert.

### 2.2.2 Calciumphosphat-Kopräzipitation

Zur Transfektion werden bei dieser Methode ein Kopräzipitat aus Calciumchlorid und DNA verwendet. Diese Komplexe adherieren an der Zellmembran und werden von der Zelle durch Endozytose aufgenommen. Die Kopräzipitate gelangen durch die Endosomen bzw. Lysosomen in das Zytoplasma und werden zum Kern transportiert. Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz werden die Zellen 6 Stunden nach Zugabe der Präzipitate mit Glycerolhaltigem Puffer behandelt (Graham *et al.* 1973; Parker *et al.* 1979).

Zur Transfektion wurden 1 x 10<sup>5</sup> MCF-7-Zellen in 6 Well-Zellkulturplatten in das entsprechende Kulturmedium eingesät und 24 Stunden kultiviert. Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium verworfen und durch das entsprechende Medium ohne FBS ersetzt. Die folgenden Vektoren wurden nach der Calciumphosphat-Kopräzipitation transfiziert:

**Tabelle 2-4: Verwendete Vektoren zur Calciumphosphat-Kopräzipitation**  
(zusätzliche Informationen siehe Anhang Abschnitt 8.4)

Vektoren	kodiertes Gen
AhR-pEGFP-C3	Arylhydrokarbon Rezeptor
NFAT-pEGFP-C3	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>

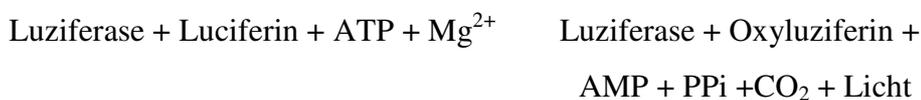
Transfektionsansatz:            10 µg Vektor-DNA  
    12,5 µl 2 M CaCl<sub>2</sub>  
    87,5 µl H<sub>2</sub>O

Nach dem Durchmischen des Transfektionsansatzes wurden 100 µl Präzipitationspuffer zugesetzt und 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Transfektionsansatz je Well den Zellen zugesetzt. Nach 6-stündiger Kultivierung bei 37 °C, 20 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen mit Glycerolhaltigem Puffer behandelt. Dazu wurde das Transfektionsmedium entfernt und die Zellen mit FBS-freiem Medium gewaschen. Danach wurde 1 ml Glycerolhaltiger Puffer zugesetzt, die Zellen 3 Minuten bei 37 °C inkubiert, mit 1 ml FBS-freiem Medium gewaschen und abschließend in frischem, FBS-haltigen Kulturmedium inkubiert. Die Zellen wurden, wie im Abschnitt 2.1.2 beschrieben, stimuliert.

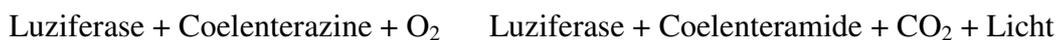
### 2.3 Reporteranalysen

Reportergene sind DNA-Sequenzen, die aus einem induzierbaren oder konstitutiven Promotorelement bestehen, das die Expression eines leicht meßbaren Enzyms kontrolliert. Die Messung der Aktivität des Reporterproteins erlaubt eine indirekte Bestimmung der Transkriptionsaktivität der Promotorsequenz unter bestimmten Bedingungen. In dieser Arbeit wurde ein Luziferase-Reportersystem benutzt. Dieses System ermöglicht die Messung der Aktivität von zwei Luziferasen. Die Expression der *Firefly*-Luziferase, ein Enzym des nordamerikanischen Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*), wird durch den zu analysierenden Promotorbereich kontrolliert. Die *Renilla*-Luziferase, ein Enzym der Seeanemone (*Renilla reniformis*) wird von dem Vektor pRLSV40 kodiert. Die Expression der *Renilla*-Luziferase, erfolgt aufgrund des SV40-Promotors konstitutiv und wird daher nur durch die Effizienz der Transfektion beeinflusst. Die verwendeten Reportervektoren, sowie sind in der Tabelle 2-2 aufgeführt. Ein Reportervektor sowie der Vektor pRLSV40 wurden, wie unter Abschnitt 2.2.1 beschrieben, kotransfiziert und die Zellen anschließend 24 Stunden stimuliert (siehe Abschnitt 2.1.2). Nach diesen 24 Stunden wurden die Luziferase-Aktivitäten mit dem *Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System* (Promega) im Sirius Luminometer (Berthold Detektion System) gemessen. Die Reaktionen beider Luziferasen sind in Abbildung 2-2 dargestellt.

Reaktion katalysiert durch die *Firefly* Luziferase:



Reaktion katalysiert durch die *Renilla* Luziferase:



**Abb. 2-2: Reaktionen der *Firefly*- und *Renilla*-Luziferase**

Für die Messung der Luziferase-Aktivitäten wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 100 µl passivem Lysepuffer versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Schüttler 3006 (Schütt Labortechnik, Göttingen) lysiert. 50 µl des Luziferase-Assay-Reagenz II, welches das Substrat der *Firefly*-Luziferase enthält, wurde in ein 6 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit 10 µl Zelllysat versetzt. Die Reaktion der *Firefly*-Luziferase findet bei einem basischen pH-Wert statt. Die *Firefly*-Luziferase-Aktivität wurde im Sirius Luminometer gemessen (wie unter 2.1.6 beschrieben). Anschließend wurden 50 µl des *Stop&Glo*-Reagenz zu diesem Ansatz pipettiert und die *Renilla*-Luziferase-Aktivität gemessen. Im Gegensatz zur *Firefly*-Reaktion findet die Reaktion der *Renilla*-Luziferase bei sauren pH-Wert statt, bei dem die Aktivität der *Firefly*-Luziferase um mehr als 99,9 % verringert ist (Dyer *et al.* 2000). Die Angabe der Lichtausbeute erfolgt in „*relative light units*“ (RLU). Zur Auswertung wurde die

*Firefly*-Luziferase-Aktivität durch die *Renilla*-Luziferase-Aktivität normalisiert. Als Kontrolle dienten die unstimulierten MCF-7- oder HepG2-Zellen.

## 2.4 Genexpressionsanalysen

### 2.4.1 RNA-Isolierung und Quantifizierung

Die RNA-Isolierung wurde nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) (Chomczynski *et al.* 1987) durch Extraktion mit Phenol und Chloroform und anschließender Isopropanol-Fällung durchgeführt. Die folgenden Schritte der Isolierung wurden auf Eis durchgeführt. Dazu wurden MCF-7- und HepG2-Zellen mit PBS gewaschen, mit 750  $\mu$ l Lyse D Puffer lysiert, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit einer Einwegspritze (Omnifix, Braun, Melsungen) homogenisiert. Danach wurden 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat pH 4, 1 Volumen Phenol, 1/5 Volumen Chloroform zugesetzt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis und eine 20-minütige Zentrifugation bei 10000 x g und 4 °C. Das Chloroform besitzt eine denaturierende Wirkung auf Proteine und stabilisiert die Trennung zwischen wäßriger und phenolischer Phase. Durch den sauren pH-Wert des Phenols wird die RNA von der DNA besser getrennt. Nach der Phasentrennung wurde die obere, wäßrige Phase in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, die RNA mit 1 Volumen Isopropanol mindestens 20 min bei -20 °C gefällt und anschließend 20 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die gefällte RNA wurde mit 500  $\mu$ l 70 % Ethanol gewaschen und 10 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die RNA luftgetrocknet und in 20  $\mu$ l DEPC-Wasser resuspendiert. DEPC inaktiviert RNasen durch kovalente Modifikation vor allem der Histidinreste im aktiven Zentrum.

Um eine Kontamination der RNA mit DNA auszuschließen, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurde folgende Reagenzien der isolierten RNA-Lösung zugesetzt:

- 1  $\mu$ l DNase (10 Units/ $\mu$ l, Promega)
- 0,5  $\mu$ l RNase Inhibitor (Promega)
- 2,5  $\mu$ l 3 M Natriumacetat pH 5,2
- 4,5  $\mu$ l 0,1 M MgSO<sub>4</sub>

Dieser Reaktionsansatz wurde 30 Minuten bei 37 °C und anschließend 10 Minuten bei 75 °C inkubiert, um die DNase zu inaktivieren. Die RNA-Lösung wurde bei 10000 x g, 4 °C eine Minute zentrifugiert und bei -20 °C gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA wurde am Photometer Ultrospec 3300 pro (Amersham Bioscience, Freiburg) durchgeführt. Die RNA wurde mit DEPC-Wasser 1:100 verdünnt. Die Messung erfolgte bei 260 nm, wobei OD<sub>260</sub> = 1 einer RNA Konzentration von 40 ng/ $\mu$ l entspricht. Zusätzlich wurde eine Messung bei 280 nm durchgeführt. Der Quotient aus der

gemessenen OD bei der Wellenlänge von 260 nm und 280 nm zeigt grundsätzlich eventuelle Proteinverunreinigungen der RNA an. Der Quotient der verwendeten RNA lag zwischen 1,7 und 2,0. Weiterhin wurde die Qualität der RNA durch Gelelektrophorese überprüft (siehe Abschnitt 2.4.4). Die Banden der 28S und 18S rRNA waren deutlich und scharf getrennt erkennbar, wobei das Verhältnis der Bandenstärke 2:1 betrug.

### 2.4.2 Reverse Transkription

Mit dieser Methode wird cDNA aus vorher isolierter RNA synthetisiert. Verwendet wurde das SUPERScript™-II-Reverse-Transkriptase-Kit (Invitrogen). Dabei hybridisieren kurze DNA-Hexanucleotide jeder möglichen Sequenzreihenfolge (*random*-Primer, Roche, Mannheim) mit der RNA, welche in einem zweiten Reaktionsschritt durch die Reverse Transkriptase mittels dNTPs entlang der Matrize in 5' → 3'-Richtung zu einer cDNA verlängert werden. Im Gegensatz zu anderen RNA-abhängigen DNA-Polymerasen baut die hier verwendete Reverse Transkriptase des Moloney-Maus-Leukämie-Virus während der cDNA-Synthese keine RNA ab.

Für einen einfachen Ansatz der Reversen Transkription wurden eingesetzt:

- x µl RNA (2 µg)
- 1 µl *random* Primer
- ad. 12 µl RNase-freies ddH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde im Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen) für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Danach wurden folgende Reagenzien zugesetzt:

- 4 µl 5 x Reaktionspuffer
- 2 µl 0,1 M DTT
- 1 µl 10 mM dNTP
- 1 µl Superscript II (200U/µl)

Dieser 20 µl Ansatz wurde kurz zentrifugiert und im Trio-Thermoblock nach folgendem Programm inkubiert: 10 min bei 20 °C, 1 h bei 42 °C, 5 min bei 90 °C. Anschließend wurden 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O zugesetzt und die cDNA bei -20 °C gelagert.

### 2.4.3 Polymerase Kettenreaktion

Die Methode der PCR dient zur Amplifikation beliebiger Nukleinsäureabschnitte. Der im Folgenden angegebene Reaktionsansatz wurde nach den Anweisungen des Taq DNA Polymerase Kits (Invitrogen) pipettiert und zusätzlich mit Mineralöl überschichtet:

---

5  $\mu$ l 10 x PCR Puffer  
 1  $\mu$ l 10 mM dNTP  
 1,5  $\mu$ l 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
 2  $\mu$ l 10  $\mu$ M Primer-Mix (Fw, Rev)  
 0,2  $\mu$ l Taq DNA Polymerase (5 Units/ $\mu$ l)  
 5  $\mu$ l cDNA  
 ad. 50  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

Die verwendeten Primer sind im Anhang Abschnitt 8.3 aufgeführt. Die PCR erfolgte in dem Trio Blockcycler nach folgendem Programm:

Initiale Denaturierung:	2 min	94 °C
40 Zyklen: Denaturierung	1 min	94 °C
Annealing	1 min	60 °C
Elongation	1 min	72 °C
Endelongation:	10 min	72 °C
Kühlung:	$\infty$	4 °C

#### 2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose ist ein lineares Polysaccharid, das durch Erhitzen in Pufferlösung eine homogene Gelmatrix bildet. Im elektrischen Feld wandern die durch ihre Phosphatgruppen negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode. Die Auftrennung der Amplifikationsprodukte bzw. der RNA nach Molekulargewicht erfolgte in einem 1,8 %-igen bzw. 1 %-igen Agarosegel. Die entsprechende Menge Agarose (SERVA, Heidelberg) wurde dazu in TAE-Puffer gelöst und mit 0,3  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid versetzt. 18  $\mu$ l Probe wurden mit 2  $\mu$ l 10-fach Ladepuffer versetzt. Im Falle von RNA wurden 1  $\mu$ g in 18  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und mit 2  $\mu$ l 10-fach Ladepuffer versetzt. Als Größenmarker diente eine 100 bp oder 1 kb DNA-Leiter (GeneRuler™ DNA Ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Die Gelelektrophorese wurde in horizontalen Elektrophoresekammern im TAE-Laufpuffer bei 75 V für 30 min durchgeführt.

#### 2.4.5 *In vitro* Transkription

Während der *in vitro* Transkription wird DNA durch eine DNA-abhängige RNA-Polymerase in RNA umgeschrieben. Die Bakteriophage *Salmonella typhimurium* kodiert die hier verwendete SP6-RNA-Polymerase (Butler *et al.* 1982). Diese RNA-Polymerase erkennt doppelsträngige DNA, die mit dem bakteriophagen-spezifischen Promotor verbunden ist. Diese Promotor-Sequenz kann über einen spezifischen Vorwärts-Primers während einer PCR mit dem 5'-Ende des amplifizierten DNA-Fragments verbunden werden (Loewy *et al.* 1989).

Zur Amplifikation der ATX-Sequenz wurden die in Tabelle 2-5 aufgeführten Primer verwendet:

**Tabelle 2-5: verwendete Primer zur *in vitro* Transkription**  
**Die SP6-Promoter Sequenz ist unterstrichen dargestellt.**

Primername	Sequenz von 5' 3'
SP6-ATX-FW	<u>GATTTAGGTGACACTATAGAATACGTTGCAAGGAAACCTTTGGA</u>
ATX-REV	AACTTCCTCTGGCATGGTTG

Die PCR und die anschließende Agarose-Gelelektrophorese wurden, wie unter Abschnitt 2.4.3 und 2.4.4 beschrieben, durchgeführt. Das durch das Ethidiumbromid fluoreszierende amplifizierte DNA-Fragment wurde unter schwachem UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die folgende Gelextraktion wurde nach der Anleitung des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die Masse des Gelstückes wurde bestimmt und mit 3 Volumen (w/v) Puffer QC versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 50°C wurde 1 Volumen (w/v) Isopropanol zugegeben und die Lösung auf eine QIAquick-Säule überführt. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 10000 x g wurde die Säule sukzessiv sowohl mit 0,5 ml Puffer QG als auch mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen. Es folgte ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt, um den restlichen PE-Puffer von der Säule zu entfernen. Nach Zugabe von 45 µl Wasser (65 °C) und 1-minütiger Inkubation bei RT wurde die DNA durch Zentrifugation eluiert. Die so aufgereinigte DNA wurde als Template für die *in vitro* Transkription eingesetzt.

Ansatz der *in vitro* Transkription:

- 13 µl extrahierte DNA
- 2 µl 1 mM NTPs
- 2 µl 10 x Puffer
- 1 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl)
- 2 µl SP6-RNA-Polymerase (40 U/µl, Roche)

Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C im Blockcycler inkubiert. Anschließend erfolgte die Fällung des spezifischen Transkripts. Dafür wurden 2,5 µl 9 M LiCl und 75 µl 96 % Ethanol hinzugegeben und die Lösung 30 min bei -80 °C inkubiert. Danach wurde 20 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand entfernt und das gefällte Transkript mit 100 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde das Transkript luftgetrocknet und in 11 µl DEPC-Wasser gelöst. Anschließend wurden 10 ng Transkript zur cDNA-Synthese wie im Abschnitt 2.4.2 beschrieben, eingesetzt. Die synthetisierte cDNA wurde als Standard in der *Real-time* PCR eingesetzt.

### 2.4.6 Real-time PCR

*Real-time* PCR ist fluoreszenzbasierte PCR zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Die Amplifikation der Nukleinsäuren wurde im Opticon II System (MJ Research, München) durchgeführt. Die verwendeten Primer sind im Anhang Abschnitt 8.3 aufgeführt. Zur Amplifikation wurde der SYBRGreen PCR Master Mix von Applied Biosystems (Darmstadt) verwendet. Der Ansatz wurde in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß nach folgenden Protokoll hergestellt:

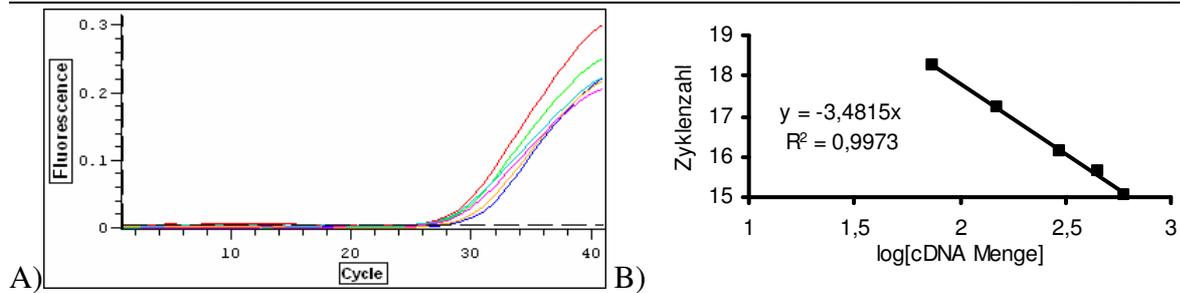
10 µl 2 x SYBRGreen PCR Master Mix  
 2 µl 10 µM Primer Mix  
 4 µl 40 ng/µl cDNA  
 ad. 20 µl ddH<sub>2</sub>O

Der SYBRGreen PCR Master Mix enthält eine *HotStart* Taq Polymerase, die durch eine 2-minütige Inkubation bei 50 °C und nachfolgende 10-minütige Inkubation bei 95 °C aktiviert wird. Dadurch wird sichergestellt, daß alle Reaktionen gleichzeitig starten. Anschließend erfolgte die Amplifikation nach folgendem Programm:

Zyklen (40 x):	Denaturierung	15 sec	95 °C
	Annealing/Elongation	30 sec	60 °C
	Fluoreszenzmessung		
Schmelzkurve:	in 0,5 °C Schritten	5 sec je Schritt	bis 99 °C

Die Quantifizierung der Proben erfolgte durch Dreifachbestimmung. Dabei wurde eine Wasserprobe als negative Kontrolle bei der Amplifikation des entsprechenden Gens mitgeführt. Zur relativen Quantifizierung der mRNA-Mengen wurde für jedes Gen parallel zu den Proben eine Verdünnungsreihe der cDNA als Standard mitgeführt. Für eine absolute Quantifizierung der mRNA-Mengen wurde im Fall von Autotaxin 2 µl einer verschieden verdünnten SP6 *in vitro* transkribierte RNA (Kehlen *et al.* 2004) und im Fall der PHD2 2 µl verschieden verdünnter Vektor-DNA (Swillens *et al.* 2004) eingesetzt.

Zur Quantifizierung der Transkriptmenge wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen verwendet. SYBRGreen interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäuren, wobei dieser Farbstoff im gebundenen Zustand eine deutlich höhere Fluoreszenz bei 492 nm aufweist als im ungebundenen Zustand. Aufgrund dieser Eigenschaften ist es möglich, die Zunahme an doppelsträngigem PCR-Produkt während der PCR in Echtzeit zu verfolgen. Je höher die Kopienzahl eines Transkriptes eines bestimmten Gens ist, desto früher kann ein Fluoreszenzanstieg detektiert werden. In Abbildung 2-3 ist ein Diagramm als Beispiel der Amplifikation des Gens Cyp1A1 mit der dazugehörigen Standardkurve aufgeführt.



**Abb. 2-3: Auswertung der quantitative *Real-time*-PCR**

- A) Darstellung der Standardverdünnungsreihe zur Cyp1A1 Amplifikation.**
- B) Darstellung der  $C_t$ -Werte der Cyp1A1 Standardverdünnungsreihe gegen den Logarithmus der Konzentration liefert eine Standardgerade.**

Die Basislinie (*Threshold*) markiert für alle Proben den Schwellenwert zwischen signifikantem Fluoreszenzanstieg und Hintergrundfluoreszenz. Der Schnittpunkt der Basislinie mit der Fluoreszenzkurve befindet sich immer in der exponentiellen Phase der Amplifikation und wird als  $C_t$ -Wert bezeichnet. Die Standardkurve gibt den linearen Zusammenhang zwischen dem  $C_t$ -Werten und dem Logarithmus der Konzentration des Standards wieder (Abb. 2-3). Durch die Verdünnung des Standards kann über die  $C_t$ -Werte eine Eichgerade gebildet werden. Diese Eichgerade wird durch eine Geradengleichung  $y = f(x)$ ,  $y = m * x + n$  definiert. Der Anstieg ( $m$ ) gibt die Effizienz der PCR wieder und wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Effizienz (E)} = 10^{(-1/m)}$$

Ein Anstieg von -3,3 entspricht einer Effizienz von 2,0 (100 %). Die Effizienzen der ausgewerteten *Real-time* PCR's variierten von 1,7 bis 2. Die Standardkurven zur absoluten Quantifizierung sind im Anhang, Abschnitt 8.5 aufgeführt. Die Standardkurven zur relativen Quantifizierung wurden anhand der eben beschriebenen Kriterien ausgewählt und sind exemplarisch für das Gen Cyp1A1 in Abbildung 2-3 dargestellt.

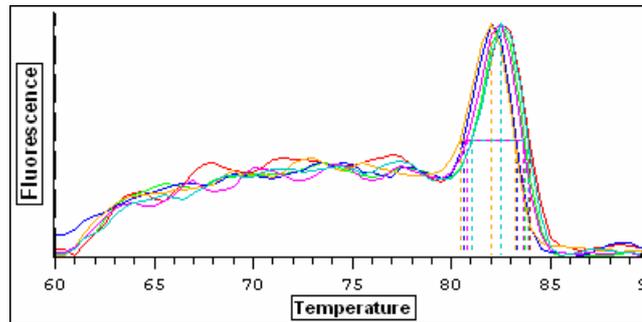
Im Fall der relativen Quantifizierung der mRNA-Menge wird die Expression des Gens mit der Expression eines Standard-Gens verglichen. In dieser Arbeit wurde als Standard-Gen 18S rRNA verwendet. Zur relativen Auswertung der Daten wurde die effizienz-korrigierte relative Quantifizierungsmethode (Pfaffl *et al.* 2001) nach folgender Formeln verwendet:

$$\begin{aligned} \text{delta Ct} &= (\text{Mittelwert Ct Kontrolle}) - (\text{Mittelwert Ct Stimulation}) \\ \text{mRNA-Expression} &= \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\text{delta Ct (Zielgen)}}}{(E_{18S})^{\text{delta Ct (18S)}}} \end{aligned}$$

Die Auswertung der absoluten Quantifizierung erfolgte durch die Standardgeradengleichung  $y = m * x + n$  nach folgenden Formeln:

$$\begin{aligned} \text{Delta Ct} &= (\text{Mittelwert Ct Gen X}) - (\text{Mittelwert Ct 18S}) \\ y &= (\text{delta ct/m}) - n \\ \text{mRNA Expression} &= 2^{(-y)} \end{aligned}$$

Bei der absoluten Quantifizierung wurde anschließend die mRNA-Menge des Gens X in fg bzw. die Kopienzahl in 1 µg Gesamt-RNA berechnet.



**Abb. 2-4: Schmelzpunktkurve des Cyp1A1-Amplifikates**  
Darstellung der 1. Ableitung der Fluoreszenzintensität nach der Temperatur.

Zur Kontrolle der Amplifikate wurden die Proben nach dem letzten PCR-Zyklus von 60 °C bis 99 °C erhitzt und dabei gleichzeitig der Verlauf der Fluoreszenzintensität verfolgt. Das Auftragen der ersten Ableitung der Fluoreszenz nach der Temperatur gegen die Zyklenzahl liefert die Schmelzpunktkurve des Produktes (Abb. 2-4). Zusätzlich wurden die Proben nach der *Real-Time* PCR in einem 1,8 %-igem Agarosegel aufgetrennt, um die Reinheit der Amplifikate zu überprüfen.

## 2.5 Proteinchemische Untersuchungen

### 2.5.1 Proteinisolation und Quantifizierung

Zur Isolation von Proteinen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 200 µl Ripa (*radio-immuno-precipitation-assay*) Puffer versetzt. Anschließend wurden die Zellen mit einer Einwegspritze homogenisiert. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (Bradford *et al.* 1976) bestimmt. Dazu wurden 1 µl der Proteinlösung mit 799 µl Wasser und 200 µl Bradford Reagenz (Biorad, München) versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation wurde die Extinktion am Ultraspec 3300 pro Photometer bei 595 nm gemessen. Die Konzentration wurde anhand einer Eichreihe (BSA-Konzentrationsreihe) ermittelt.

### 2.5.2 Fraktionierung

Die Kernfraktion von MCF-7-Zellen wurde mit dem Kernextraktionskit von Active Motif (Rixensart, Belgien) wie folgt isoliert. Die Zellen wurden wie unter Abschnitt 2.1.2 abgelöst, mit PBS gewaschen, anschließend mit 3 ml PBS/Phosphatase-Inhibitoren (Cocktail 2: für Tyrosinproteinphosphatasen und der sauren und alkalinen Phosphatase) versetzt, in ein 15 ml Reaktionsröhrchen überführt und bei 1000 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl hypotonischen Puffer resuspendiert und 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine 1-minütige Zentrifugation bei 13000 x g und 4 °C. Der Überstand

enthielt die zytoplasmatische Fraktion der Zellen. Das Pellet wurde in 50 µl Lysepuffer resuspendiert, 30 Minuten im Schüttler 3006 lysiert, danach 10 Minuten bei 13000 x g, 4 °C zentrifugiert und anschließend der Überstand (Kernfraktion) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinbestimmung erfolgte wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben.

### 2.5.3 SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese

Akrylamid ist ein Monomer, daß durch Zufügen freier Radikale über ein Zweikomponenten-Redoxsystem Polymere ausbildet und in Gegenwart von N,N'-Methylen-bisakrylamid in einer Kettenreaktion zu einer Gelmatrix, dem Polyakrylamid quervernetzt wird. SDS dringt mit seinen lipophilen aliphatischen Ketten in das Innere der gefalteten Proteine und zerstört deren Tertiärstruktur. Die Eigenladung der Proteine im Vergleich zur negativen Gesamtladung der SDS-Proteinkomplexe ist vernachlässigbar. Alle Proteine sind über ein konstantes Ladungs/Masse-Verhältnis miteinander vergleichbar.

Die Gelelektrophorese wurde mit unterschiedlich konzentrierten Gelen durchgeführt. Um Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 90 kDa zu detektieren, wurden 6 %-ige Gele und für Proteine mit einem niedrigeren Molekulargewicht wurden 8 %-ige Gele verwendet. Die Zusammensetzung der unterschiedlich konzentrierten Gele ist in Tabelle 2-6 dargestellt. Für die SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese wurden 50 – 100 µg Protein in 40 µl Tris/Glycin-SDS-PAGE-Laufpuffer aufgenommen und mit 12 µl SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden anschließend bei 70 °C für 10 min im Wasserbad denaturiert. Zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben wurden 5 µl des *prestained* Protein Markers (MBI, Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V über 30 min und danach bei 180 V über 80 min im oben genannten Laufpuffern.

**Tabelle 2-6: Pipetierschema für Polyakrylamidgele**

Dieses Schema wurde aus "Molecular Cloning, A laboratory manual", Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sambrook, Fritsch, Maniatis, New York, 1989) entnommen.

	6 % SDS Trenngel	8 % SDS Trenngel	Sammelgel
<b>Wasser</b>	5,3 ml	4,6 ml	2,4 ml
<b>30 % Akrylamid</b>	2 ml	2,7 ml	0,5 ml
<b>1,5 M Tris/HCl pH 8,8</b>	2,5 ml	2,5 ml	-
<b>0,5 M Tris/HCl pH 6,8</b>	-	-	1 ml
<b>10 % SDS</b>	100 µl	100 µl	40 µl
<b>10 % APS</b>	100 µl	100 µl	40 µl
<b>TEMED</b>	6 µl	6 µl	6 µl



Nach dreimaligem Waschen mit TBST erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers in 3 % BSA-TBST-Lösung und danach eine 1- bis 2-stündige Inkubation bei RT. Es wurden als Sekundärantikörper entweder Ziege Anti-Maus IgG (HRP konjugiert, 1:10000, dianova, Hamburg) oder Ziege Anti-Kaninchen (HRP konjugiert, 1:1000, Invitrogen) verwendet.

#### *2.5.4.4 Detektion*

Alle verwendeten Sekundärantikörper sind mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt, um zur Detektion der spezifisch gebundenen Primärantikörper die Chemilumineszenz zu nutzen. Zur Detektion wurde die Membran wiederum dreimal mit TBST und einmal mit TBS gewaschen. Es folgte entweder eine Inkubation für 5 min in einer 1:1-Lösung von Immobilon Western Chemilumineszenz HRP Substrat und Puffer (Millipore, Eschborn) oder eine Inkubation für 1 min in einer 1:1-Lösung von ECL Reagenz 1 und 2 (ECL Western Blotting Detection Reagent, Amersham Bioscience). Die Detektion erfolgte mit einem ECL High performance chemiluminescence Film (Amersham Bioscience).

#### *2.5.4.5 Strippen der Membran*

Die Membran wurde mit der Stripping-Lösung für 30 min bei 70 °C inkubiert, wodurch alle vorher gebundenen Antikörper entfernt werden. Danach erfolgte dreimaliges Waschen mit TBST und Blocken, bevor erneut Antikörper zugesetzt werden konnten.

### **2.5.5 Fluoreszenzmikroskopie**

Zur intrazellulären Lokalisation der überexprimierten, an das Fluoreszenzprotein EGFP gekoppelten Proteine wurde die Fluoreszenzmikroskopie genutzt. Das EGFP ist eine Variante des Wildtyp-grün-fluoreszierenden Proteins, bei dem das Phenylalanin 64 durch Leucin und das Serin 65 durch Threonin ersetzt wurde. Somit besitzt das verwendete Fluorochrom EGFP eine rot verschobene Fluoreszenz mit einem Anregungsmaximum bei 488 nm und einem Emissionsmaximum bei 507 nm.

Zur Vorbereitung der Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen auf Deckgläschen eingesät, transfiziert und stimuliert, wie in den Abschnitten 2.2.2 und 2.1.2 beschrieben. Anschließend wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen, für 30 Minuten mit 4 % PFA/PBS fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Anfärbung der Zellkerne mittels 7-Amino-Actinomycin (7-AAD), wofür die Zellen 30 Minuten mit 20 µg/ml 7-AAD bei RT inkubiert wurden. Der eingesetzte Fluorophor hat ein Anregungsmaximum bei 546 nm und ein Emissionsmaximum bei 647 nm. Dieser Fluorophor hat ein Anregungsmaximum bei 546 nm und ein Emissionsmaximum bei 647 nm. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und abschließend die Deckgläschen mit Moviol auf einem Objektträger fixiert. Die Zellen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 (Zeiss, Jena) und der Axio-



anschließend für den Hitzeschock 30 sec lang bei 42 °C inkubiert. Nach 2-minütiger Abkühlung auf Eis wurden 960 µl LB-Medium zugegeben und alles über einen Zeitraum von 1 h unter horizontalem Schütteln bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Zur Selektion der transformierten Bakterien wurden Agarplatten mit Kanamycin (50 µg/µl) oder Ampicillin (200 µg/µl) hergestellt. Anschließend erfolgte das Ausplattieren der im LB-Medium inkubierten Bakterien. Nach 16-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Kolonien gepickt und in 3 ml LB-Kulturmedium (versetzt mit 50 µg/µl Kanamycin oder Ampicillin 100 µg/µl) über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

## 2.6.2 Plasmidpräparationen

### 2.6.2.1 Mini-Plasmidpräparation

Die in den LB-Medien herangewachsenen Bakterien bildeten die Grundlage, um die Plasmidpräparation nach dem Herstellerprotokoll des GFX MicroPlasmid-Kit (GE Healthcare, München) durchzuführen. Dazu wurde die Bakteriensuspension bei 2600 x g zentrifugiert. Nach dem Resuspendieren der Bakterien in 250 µl Puffer P1 (enthält RNase A) wurde die Bakteriensuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 250 µl Lysepuffer P2 und mehrfachen Invertieren lysiert. Nach der Zugabe von 350 µl Neutralisationspuffer N3 und mehrfachen Invertieren des Gefäßes erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 10000 x g zum Pelletieren von ausgefallenen Proteinen, genomischer DNA und Zellresten. Der Überstand wurde auf die QIAprep-Säule gegeben. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 10000 x g wurde die Säule mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen und danach erneut für 1 min bei 10000 x g zentrifugiert. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt wurde der restliche Waschpuffer entfernt. Nach Zugabe von 50 µl Wasser (65 °C) und 1-minütiger Inkubation wurde die DNA durch eine weitere 1-minütige Zentrifugation eluiert. Danach wurde ein Restriktionsverdau, wie unter Abschnitt 2.6.3 beschrieben, durchgeführt.

### 2.6.2.2 Midi-Plasmidpräparation

Nach einem Kontroll-Restriktionsverdau wurden die korrekten Klone vervielfältigt. Dazu wurde die entsprechende Kolonie gepickt, in 3 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika überführt und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 300 µl dieser Vorkultur in 150 ml antibiotika-haltiges LB-Medium (50 µg/µl Kanamycin oder Ampicillin 100 µg/µl) überführt. Nach weiteren 16 h Inkubation bei 37 °C unter Schütteln wurden die Zellen mittels Zentrifugation bei 4500 x g geerntet. Nach dem Resuspendieren der Zellen in 4 ml Puffer P1 (enthält RNase A) wurde die Bakteriensuspension in ein Reaktionsgefäß überführt, durch Zugabe von 4 ml Lysepuffer P2, mehrfachen Invertieren und 5-minütiger Inkubation bei RT lysiert. Nach der Zugabe von 4 ml Neutralisationspuffer N3 und mehr-

fachen Invertieren des Gefäßes erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 4 °C. Der Überstand wurde auf die QIAprep-Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen. Durch Zugabe von 5 ml QF Puffer wurde die DNA eluiert. Danach erfolgte durch Zugabe von 5 ml Isopropanol und nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 10000 x g, 4 °C die Fällung der DNA. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und abschließend in 500 µl Wasser aufgenommen.

### 2.6.2.3 Glycerinkulturen

150 µl steriles Glycerin wurden mit 850 µl Bakterienkultur in Kryo-Röhrchen vermischt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

## 2.6.3 Restriktionsverdau

Endonukleasen, die DNA sequenzspezifisch schneiden, bezeichnet man als Restriktionsendonukleasen. Restriktionsendonukleasen erkennen vier bis acht Basenpaare einer Sequenz (ein Palindrom), die in der Regel eine zweizählige Symmetrieachse bilden. Je nach Enzym kann die Hydrolyse der Phosphorsäurediesterbindung entweder symmetrisch oder um mehrere Nucleotide versetzt erfolgen. Die isolierten Vektoren wurden einem Restriktionsverdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen (New England BioLabs, Frankfurt/M) unterzogen, um zu verifizieren, dass die Vektoren die korrekten *Inserts* in der korrekten Orientierung tragen. Informationen zu den Vektoren sowie den verwendeten Restriktionsenzymen sind im Anhang Abschnitt 8.4 aufgeführt.

Restriktionsverdau:

- x µl 1 µg Vektor
- 2 µl 10x Puffer
- 0,5 µl Enzym 1 (10 U/µl)
- 0,5 µl Enzym 2 (10 U/µl)
- 0,5 µl Enzym 3 (10 U/µl)
- ad. 20 µl H<sub>2</sub>O
- mit 45 µl Mineralöl überschichtet

Die Restriktion erfolgte für 2 h bei 37 °C im T3-Thermocycler (Biometra).

## 2.7 Statistische Analyse

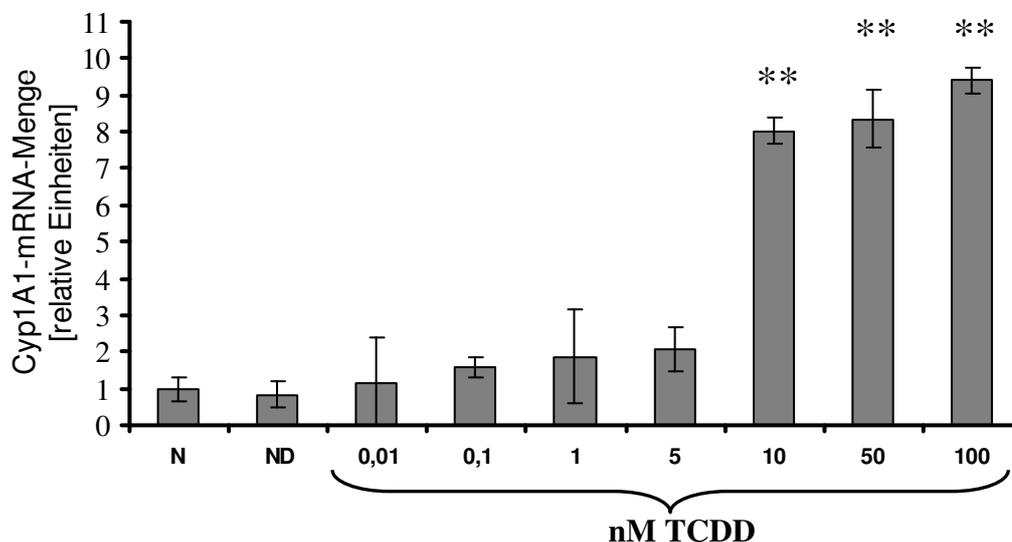
Der Student *t*-Test bzw. ein zweiseitiger ANOVA-Test wurde zur Bestimmung der signifikanten Abweichung zwischen den Datenmengen genutzt (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ). Die Versuchswiederholungen der aufgeführten Experimente (n) sind jeweils mit angegeben.

### 3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Kapitel 3.1 bis 3.4 aus dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht (Seifert *et al.* 2007).

#### 3.1 Aktivierung des AhR-Signalweges nach Stimulation mit TCDD in MCF-7-Zellen

Der Einfluss von TCDD und/oder Hypoxie auf den AhR-Signalweg wurde in der Brustkrebszelllinie MCF-7 durch Analysen der Translokation eines AhR-GFP-Fusionsproteins, der Aktivierung des AhR-spezifischen *Response*-Elementes XRE und der Induktion des Zielgenes Cyp1A1 untersucht.

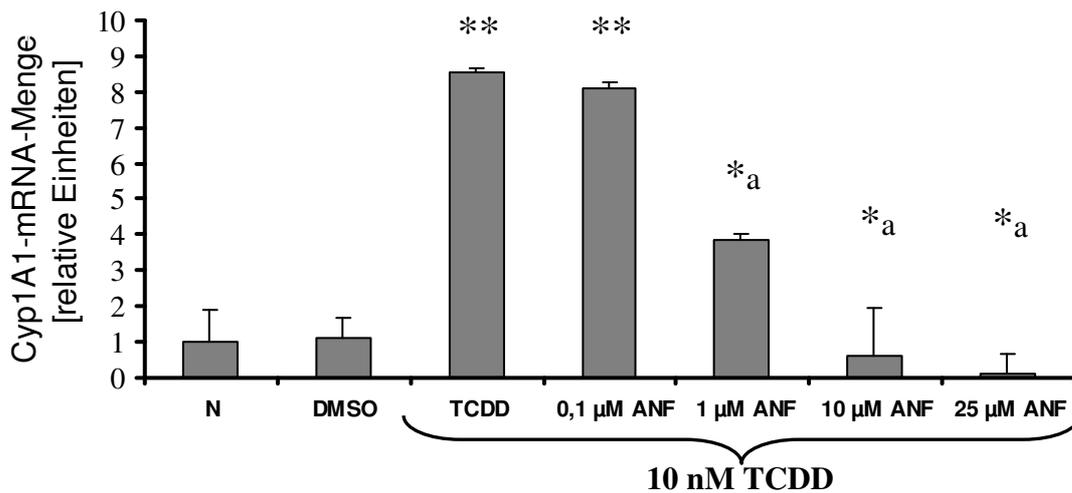


**Abb. 3-1: Konzentrationsabhängige Induktion der Cyp1A1-mRNA-Menge durch TCDD nach 24 Stunden in MCF-7-Zellen. Die Cyp1A1-mRNA-Menge wurde zur 18S-rRNA-Menge normalisiert. N – unstimulierte Kontrolle; ND – DMSO-Kontrolle (\*\* p < 0,001 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, n = 2)**

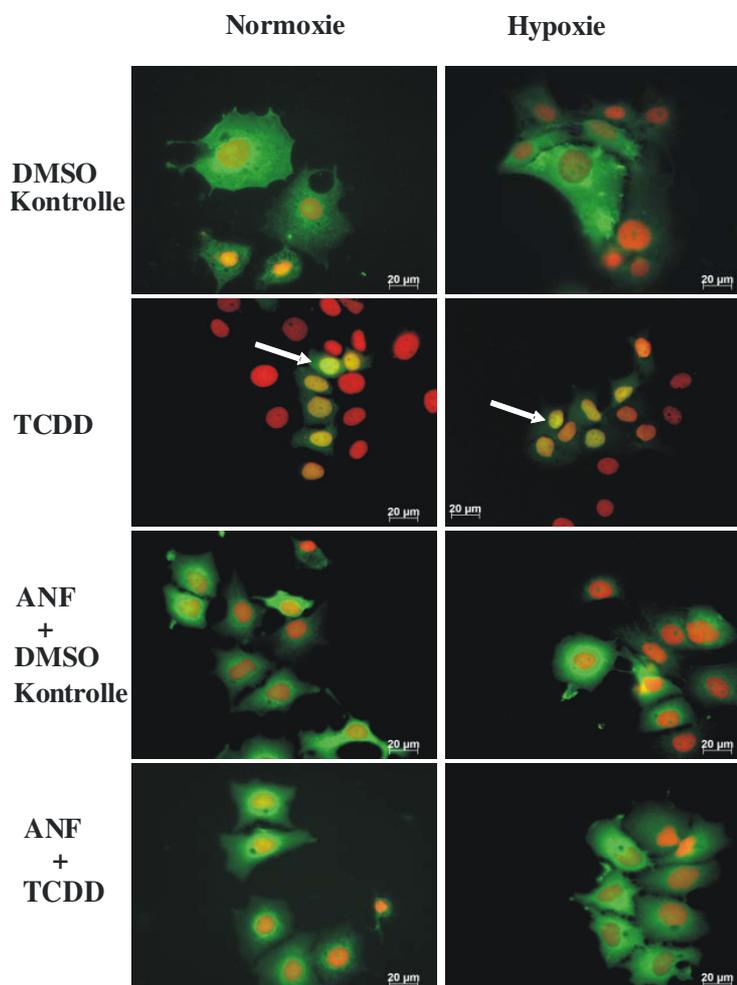
Die Aktivierung des AhR-Signalweges wurde mittels *Real-time* PCR durch die Induktion der Cyp1A1-mRNA-Menge nach 24 Stunden ermittelt. Signifikante Steigerungen der relativen Cyp1A1-mRNA-Menge wurden durch Stimulation mit 10 nM bis 100 nM TCDD erreicht (Abb. 3-1). Der AhR-spezifische Antagonist ANF (Henry *et al.* 1999) hemmt die Induktion der Cyp1A1-mRNA-Menge nach Stimulation mit 10 nM TCDD konzentrationsabhängig. 10  $\mu$ M ANF inhibiert die TCDD- (10 nM) vermittelte Induktion der Cyp1A1-mRNA-Menge vollständig (Abb. 3-2 A).

Zur Analyse des Zeitablaufs der AhR-Aktivierung durch Translokationsstudien wurden 10 nM TCDD eingesetzt. Das AhR-GFP-Fusionsprotein ist in unstimulierten MCF-7-Zellen im Zytoplasma lokalisiert. Die Zellkerne wurden mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff 7-AAD

A)



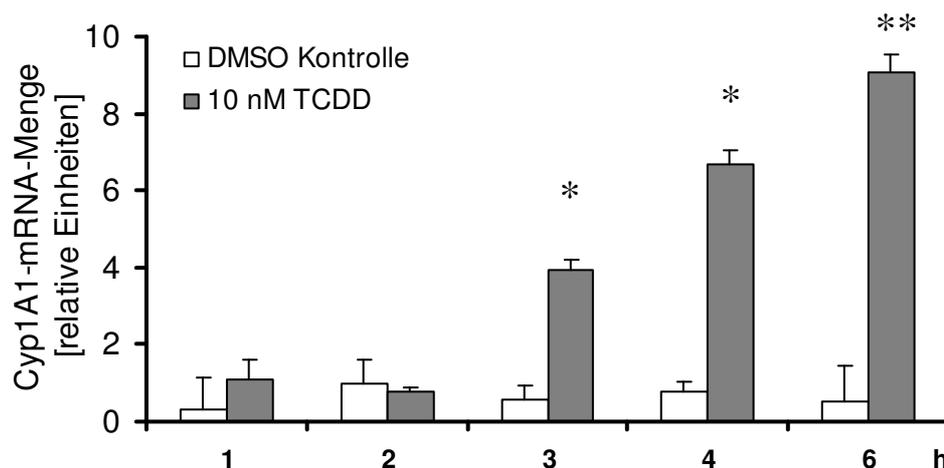
B)



**Abb. 3-2: Inhibierung der Cyp1A1-mRNA-Menge (A) und Lokalisation des AhR-GFP-Fusions-Proteins (B) in MCF-7-Zellen. A) Inhibierung der Cyp1A1-mRNA-Menge durch ANF nach 24 h. Die Cyp1A1-mRNA-Menge wurde zur 18S-rRNA-Menge normalisiert. N – unstimulierte Kontrolle (n = 2, \*\* p < 0,001 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a p < 0,05 im Vergleich mit der TCDD-vermittelten Induktion, n = 3), B) Lokalisation des AhR-GFP-Fusionsproteins nach 2,5-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. Die Zellkerne wurden mit 7-AAD markiert (n = 3).**

lokalisiert. Dies ist anhand der gelben bis orangen Fluoreszenz der Kerne ersichtlich, die durch die Überlappung der roten und grünen Fluoreszenz zustande kommt. Die TCDD-vermittelte Translokation des AhR in den Kern kann durch 10  $\mu$ M ANF inhibiert werden (Abb. 3-2 B).

Der Zeitverlauf der Induktion der AhR-vermittelten Zielgenexpression wurde am Beispiel Cyp1A1 mittels *Real-time* PCR verfolgt. Nach 3 bis 6 Stunden Stimulation mit 10 nM TCDD erfolgt eine signifikante Induktion der relativen Cyp1A1-mRNA-Menge, wobei die stärkste TCDD-Wirkung nach 6 Stunden beobachtet werden konnte (Abb. 3-3).



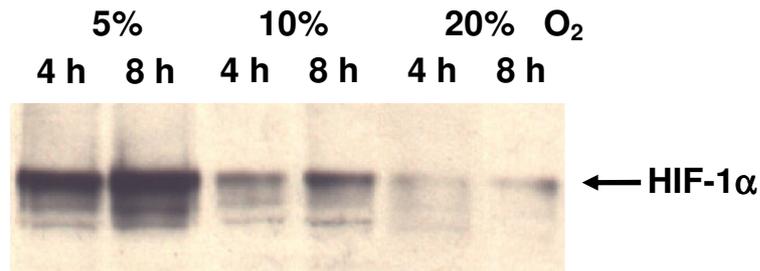
**Abb. 3-3: Zeitabhängige Induktion der relativen Cyp1A1-mRNA-Menge durch 10 nM TCDD in MCF-7-Zellen. Die Cyp1A1-mRNA-Menge wurde zur 18S-rRNA-Menge normalisiert. (\*  $p < 0,05$  oder \*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle,  $n = 3$ )**

Die Untersuchungen zur konzentrations- und zeitabhängigen Aktivierung des AhR zeigten, dass eine signifikante Induktion der Cyp1A1-Transkriptmenge nach 6-stündiger Stimulation mit 10 nM TCDD eindeutig detektiert werden kann.

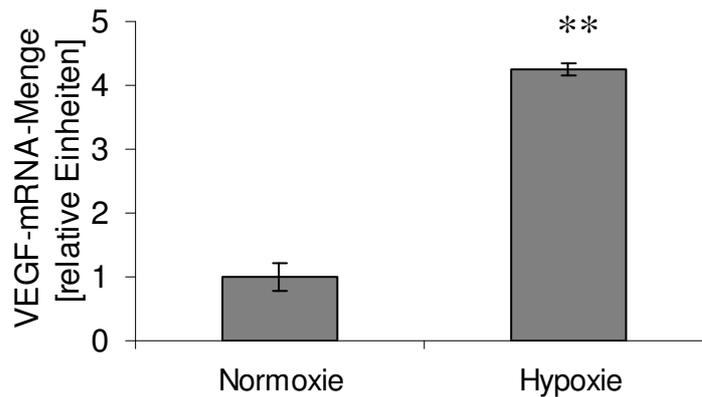
### **3.2 Aktivierung des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges nach Kultivierung von MCF-7-Zellen unter hypoxischen Bedingungen**

Posttranskriptionelle Modifikationen vermitteln den Abbau und verhindern die Stabilisierung des HIF-1 $\alpha$ -Proteins. Eine transkriptionelle Regulation unter hypoxischen Bedingungen konnte in MCF-7-Zellen ausgeschlossen werden (Anhang Abschnitt 7.1.2. A). Die Stabilisierung des HIF-1 $\alpha$ -Proteins wurde nach Stimulation mit verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen im Western Blot untersucht. Eine Verringerung der Sauerstoffkonzentration von 20 % (Normoxie) auf 5 % (Hypoxie) erhöhte die HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung. Nach 4 Stunden in 5 % bis 10 % Sauerstoff konnten bereits erhöhte HIF-1 $\alpha$ -Mengen in MCF-7-Zellen detektiert werden. Eine Verstärkung dieser HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung wurde nach 8 Stunden beobachtet (Abb. 3-4).

A)



B)



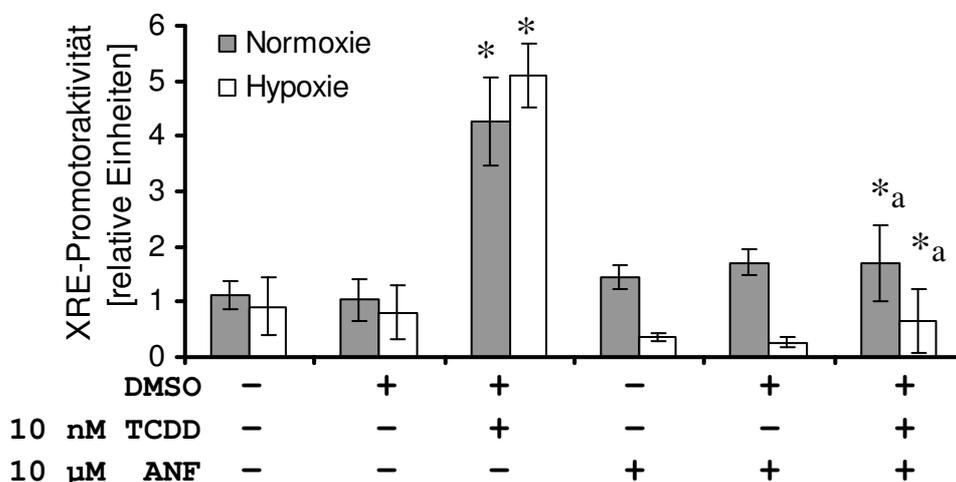
**Abb. 3-4: Akkumulierung von HIF-1 $\alpha$  (A) und Induktion der relative VEGF-mRNA-Menge (B) unter hypoxischen Bedingungen in MCF-7-Zellen. A) Konzentrations- und zeitabhängige Akkumulierung von HIF-1 $\alpha$  (Navarette Santos, unveröffentlicht, n = 2), B) Relative VEGF-mRNA-Menge nach 6-stündiger Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen (5 % O<sub>2</sub>). Die VEGF-mRNA-Menge wurde zur 18S-rRNA-Menge normalisiert. (\*\* p < 0,001 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, n = 3)**

Die relative mRNA-Expression des HIF-1 $\alpha$ -Zielgens VEGF wurde aufgrund der starken Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  unter 5 % Sauerstoff nach 6 Stunden untersucht. Es konnte eine 4,5-fache Erhöhung der relativen VEGF-mRNA-Menge unter diesen hypoxischen Bedingungen detektiert werden (Abb. 3-4).

### **3.3 Aktivierung des AhR-Signalweges nach Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie**

Die Untersuchungen zur Aktivierung des AhR bzw. zur Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  durch 10 nM TCDD bzw. Hypoxie (5 % O<sub>2</sub>) haben gezeigt, dass eine signifikante Induktion der jeweiligen Signalwege nach 6 Stunden deutlich erkennbar war. Der Einfluss einer simultanen Stimulation mit 10 nM TCDD und Hypoxie (5 % O<sub>2</sub>) auf den AhR-Signalweg wird im Folgenden gezeigt. Für die Untersuchung der Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -Signalweg wurde neben der Zelllinie MCF-7 zum Vergleich die Zelllinie HepG2 mitgeführt, um etwaige zelllinienspezifische Unterschiede beschreiben zu können.

Die Aktivierung des AhR-Signalweges durch TCDD und/oder Hypoxie wurde durch Reporter-Experimente untersucht. Dafür wurden die Zellen mit einem Luciferase-Expressions-konstrukt, das das AhR-spezifische *Response*-Element XRE enthält, transfiziert und anschließend für 24 Stunden stimuliert. Gemessen wurden anschließend die Aktivität der *Firefly*-Luciferase, deren Expression durch das *Response*-Element bestimmt wird, sowie die Aktivität der *Renilla*-Luciferase, deren Expression von einem konstitutiven SV40-Promotor abhängt und durch die Effizienz der Transfektion bestimmt wird. In MCF-7- und HepG2-Zellen konnte eine 5-fache bzw. 14- bis 16-fache Induktion der XRE-vermittelten Promotoraktivität nach Stimulation mit 10 nM TCDD unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen beobachtet werden (Abb. 3-5, Anhang Abschnitt 7.1.1.A). Im Gegensatz zu den MCF-7-Zellen wurde in HepG2-Zellen eine signifikante Verringerung der Induktion der XRE-vermittelten Promotoraktivität nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie im Vergleich zur TCDD-vermittelten Induktion unter normoxischen Bedingungen beobachtet. In HepG2-Zellen verringerte die alleinige Stimulation mit Hypoxie die XRE-vermittelte Promotoraktivität im Vergleich zur normoxischen Kontrolle (Anhang Abschnitt 7.1.1. A). Die TCDD-vermittelte Promotoraktivierung kann durch 10  $\mu$ M ANF inhibiert werden (Abb. 3-5, Anhang Abschnitt 7.1.1.A).

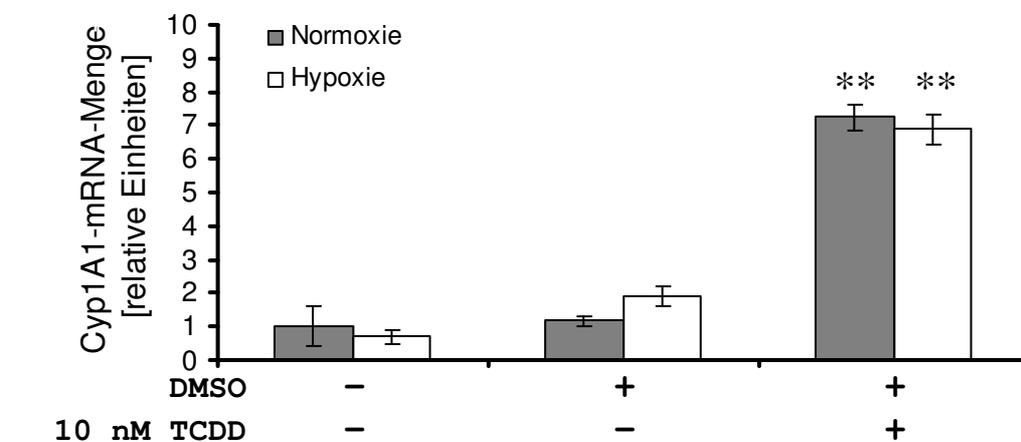


**Abb. 3-5: XRE-Promotoraktivität nach 24-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie in MCF-7-Zellen. Die Aktivität der *Firefly*-Luciferase wurde durch die *Renilla*-Luciferase-Aktivität normalisiert. (\*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a  $p < 0,05$  im Vergleich mit der TCDD-vermittelten Induktion,  $n = 3$ )**

Die AhR-vermittelte Induktion des Zielgenes Cyp1A1 nach Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie wurde mittels *Real-time* PCR und Western Blot untersucht. In der Zelllinie MCF-7 wurde die Cyp1A1-mRNA- bzw. Proteinmenge durch TCDD 7-fach bzw. 1,3-fach unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen induziert (Abb. 3-6). Die TCDD-vermittelte

Induktion der Cyp1A1-Proteinmenge in MCF-7-Zellen kann durch 10  $\mu$ M ANF inhibiert werden (Anhang Abschnitt 7.1.1. D). Im Unterschied zu MCF-7-Zellen weist die Cyp1A1-Expression in HepG2-Zellen Unterschiede nach der Stimulation mit TCDD unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen auf. Hypoxie verringert die TCDD-vermittelte Induktion der relativen Cyp1A1-mRNA-Menge von 12-fach auf 9-fach (Anhang Abschnitt 7.1.1. B). Die Cyp1A1-Proteinmenge kann durch 10 nM TCDD 2,3-fach erhöht werden. Hypoxie verringert die TCDD-vermittelte Induktion auf den 1,8-fachen Wert (Anhang 7.1.1. C). Die TCDD-vermittelte Induktion der Cyp1A1-Proteinmenge in HepG2-Zellen kann durch 10  $\mu$ M ANF inhibiert werden (Anhang 7.1.1. D).

A)



B)

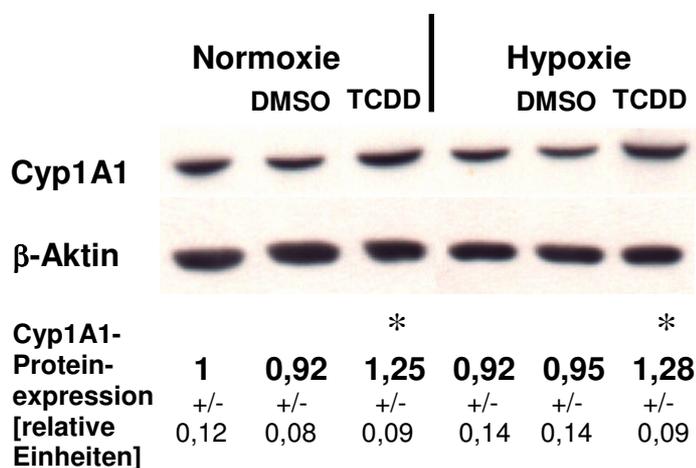


Abb. 3-6: Cyp1A1-mRNA-Menge (A) und Proteinmenge (B) nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie in MCF-7-Zellen. Die Cyp1A1-mRNA-Menge wurde zur 18S-rRNA-Menge normalisiert. Die Cyp1A1-Proteinmenge wurde zur  $\beta$ -Aktin-Proteinmenge normalisiert. (\* p < 0,05 oder \*\* p < 0,001 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, n = 3)

### 3.4 Aktivierung des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges nach Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie

Der Einfluss einer simultanen Stimulation mit 10 nM TCDD und Hypoxie (5 % O<sub>2</sub>) auf den HIF-1 $\alpha$ -Signalweg wurde in MCF-7- und HepG2-Zellen untersucht. Um eine transkriptionelle Regulation des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  bei den verschiedenen Stimulationen auszuschließen, wurde die HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Menge semiquantitativ mittels PCR untersucht. Es konnte keine Änderung in der HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Menge in MCF-7-Zellen detektiert werden (Anhang Abschnitt 7.1.2. A).

Die HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung nach Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie wurde mittels Western Blot untersucht. Unter hypoxischen Bedingungen wurde die HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge in MCF-7-Zellen 10-fach und in HepG2-Zellen 8-fach erhöht. Zusätzliche TCDD-Stimulation verringerte die Hypoxie-vermittelte HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung auf das 5-fache bzw. das 6-fache in MCF-7- bzw. HepG2-Zellen. Der AhR-spezifische Inhibitor ANF verhindert die TCDD-vermittelte Reduktion der HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung unter hypoxischen Bedingungen (Abb. 3-7, Anhang Abschnitt 7.1.2. B).

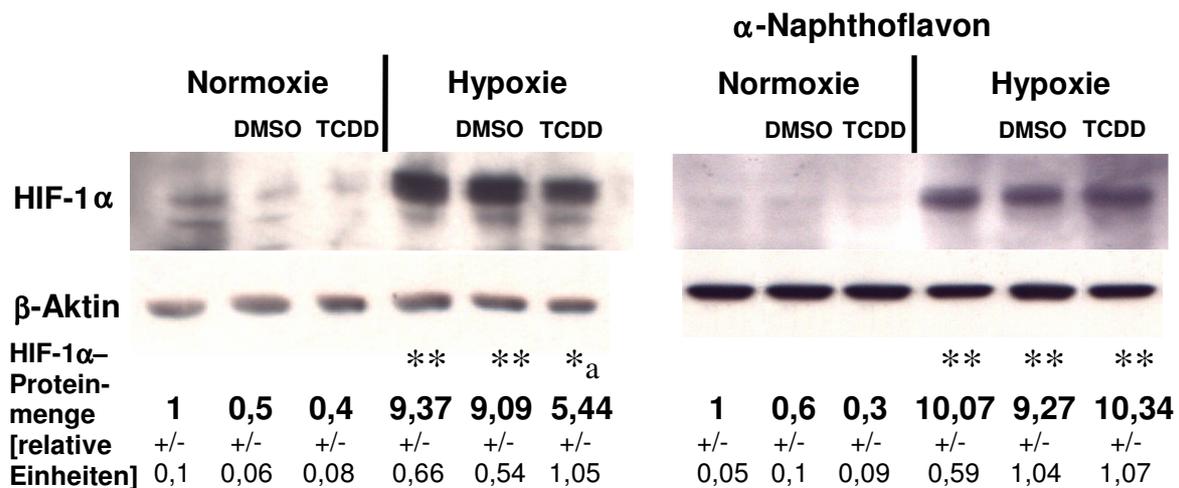
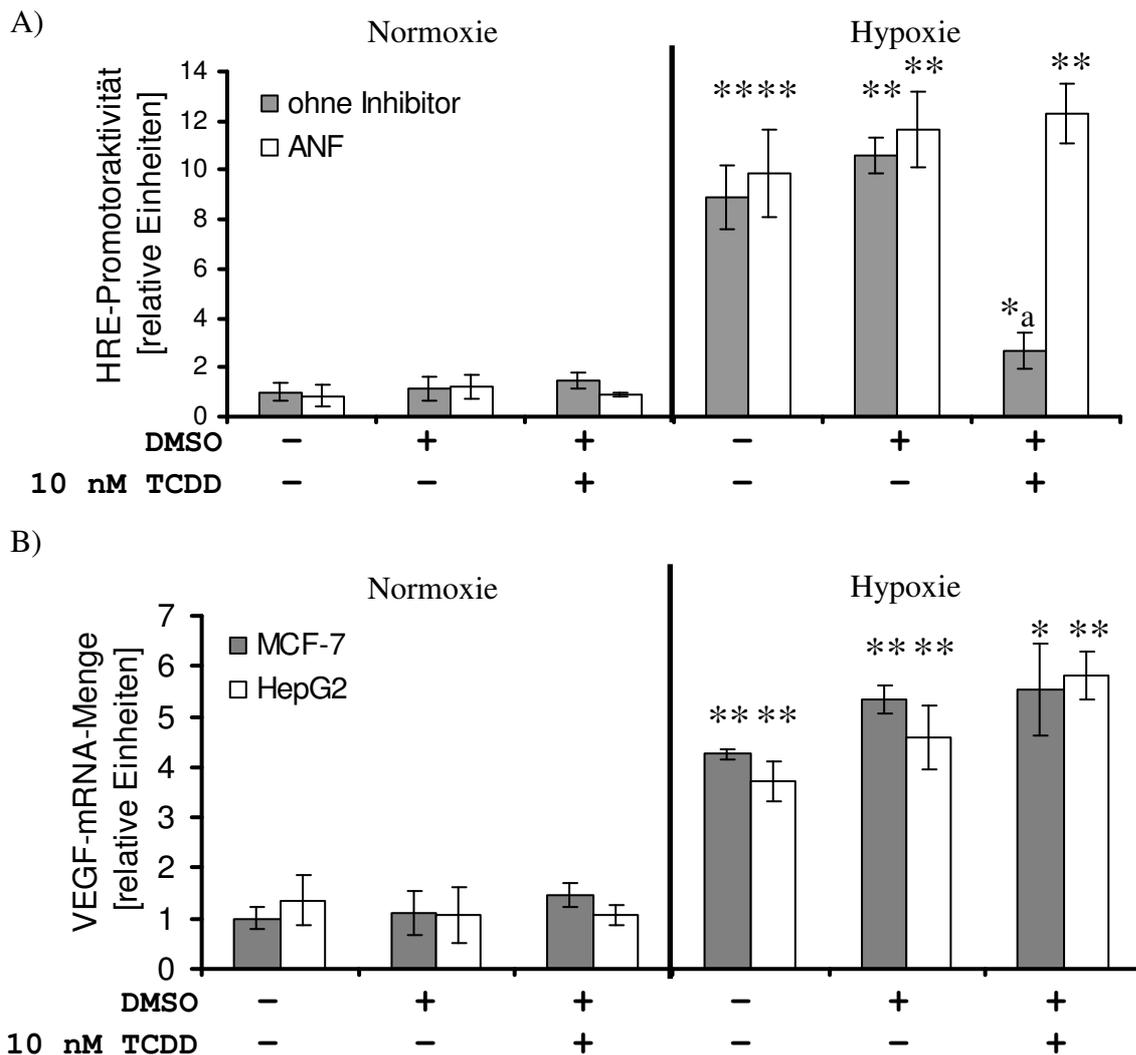


Abb. 3-7: HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie in MCF-7-Zellen. Die HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge wurde zur  $\beta$ -Aktin-Proteinmenge normalisiert. (\*\* p < 0,001 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a p < 0,05 im Vergleich mit der Hypoxie-vermittelten Induktion, n = 3)

Die Aktivierung des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges durch TCDD und/oder Hypoxie wurde weiterhin durch Reporter-gen-Experimente untersucht. Dafür wurden die Zellen mit einem Luziferase-Expressionkonstrukt, welches das HIF-1 $\alpha$ -spezifische *Response*-Element HRE enthält, transfiziert und für 24 Stunden stimuliert. In MCF-7- bzw. HepG2-Zellen konnte eine 8-fache bzw. 3-fache Induktion der HRE-vermittelten Promotoraktivität unter hypoxischen Bedingungen beobachtet werden. Gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie verringerte die

Hypoxie-vermittelte Induktion auf das 2-fache. Die zusätzliche Inhibierung mit ANF verhinderte diese TCDD-vermittelte Reduktion (Abb. 3-8, Anhang Abschnitt 7.1.2. C). In HepG2-Zellen erhöht die ANF-Stimulation unter hypoxischen Bedingungen die HRE-vermittelte Promotoraktivität im Vergleich zur hypoxischen Induktion (Anhang Abschnitt 7.1.2. C).

Das HIF-1 $\alpha$ -Zielgen, der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF, ist 4-fach unter hypoxischen Bedingungen und 6-fach nach zusätzlicher TCDD Stimulation in MCF-7- und HepG2-Zellen induziert (Abb. 3-8 B).



**Abb. 3-8: HRE-Promotoraktivität (A) und die relative VEGF-mRNA-Menge (B) nach Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie in MCF-7-Zellen. A) HRE-Promotoraktivität nach 24-stündiger Stimulation. Die Aktivität der *Firefly*-Luziferase wurde durch die *Renilla*-Luziferase-Aktivität normalisiert. B) Die relative Cyp1A1-mRNA-Menge nach 6-stündiger Stimulation. Die Cyp1A1-mRNA-Menge wurde zur 18S-rRNA-Menge normalisiert. (\*  $p < 0,05$  oder \*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a  $p < 0,05$  im Vergleich mit der Hypoxie-vermittelten Induktion,  $n = 3$ )**

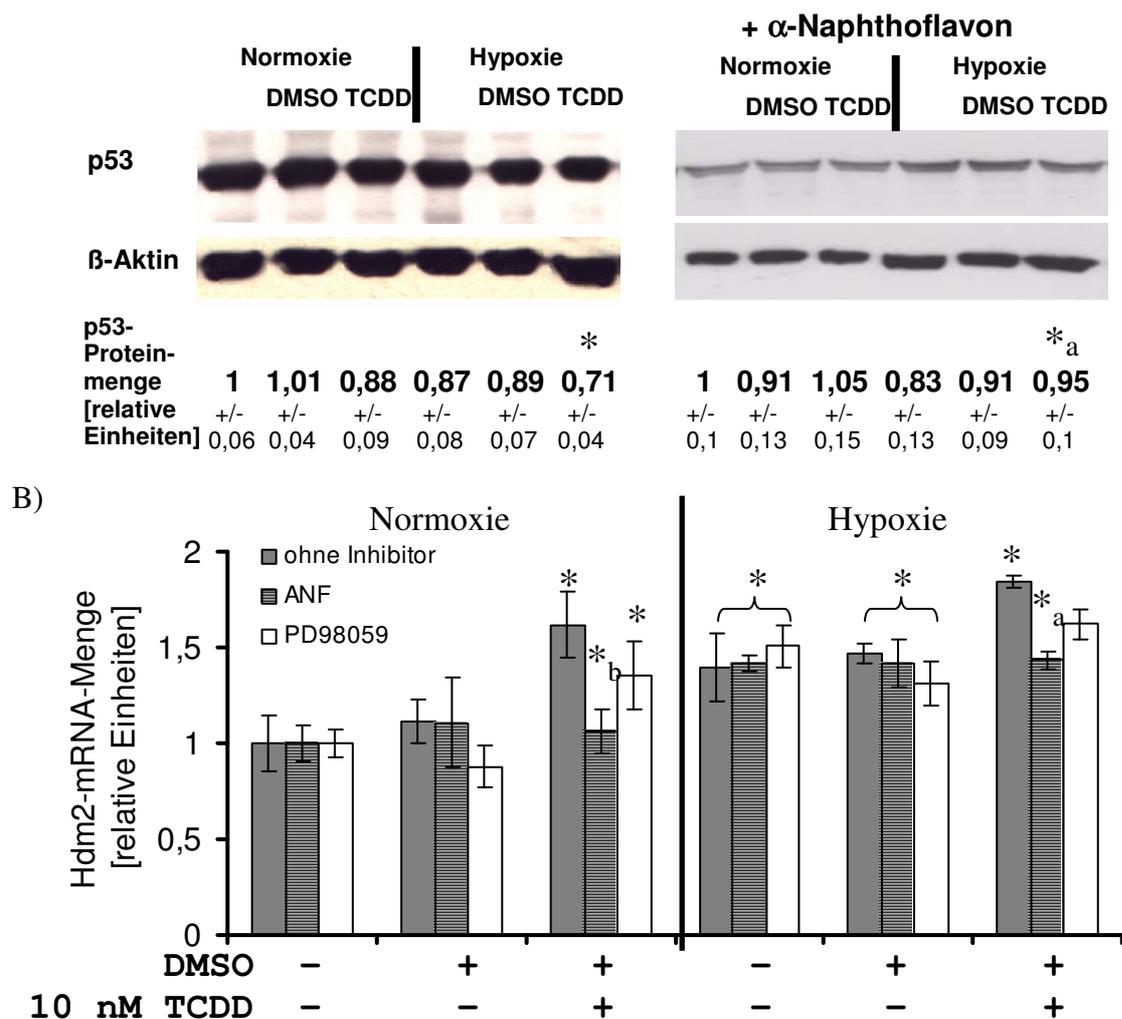
Durch den Vergleich der Effekte in MCF-7- und HepG2-Zellen können zusammenfassend folgende Auswirkungen einer gleichzeitigen Stimulation mit TCDD und Hypoxie auf die Aktivierung des AhR- und HIF-1 $\alpha$ -Signalweges beschrieben werden. Eine gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie reduziert die TCDD-vermittelte Aktivierung des AhR-Signalweges in HepG2-Zellen, jedoch nicht in MCF-7-Zellen. TCDD reduzierte die HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung und transkriptionelle Aktivität unter hypoxischen Bedingungen in MCF-7- und HepG2-Zellen. Der AhR- und der HIF-1 $\alpha$ -Signalweg interferieren in beiden Zelllinien.

### **3.5 Einfluss von TCDD und Hypoxie auf den p53- und den ER $\alpha$ -Signalweg**

In Abschnitt 3.1. bis 3.4. konnte gezeigt werden, dass eine gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie in MCF-7-Zellen eine Inhibierung des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges verursacht, während der TCDD-induzierte AhR-Signalweg nicht verändert wurde. Aufgrund des in der Literatur beschriebenen Einflusses des AhR-Signalweges auf den ER $\alpha$ -Signalweg (siehe Abschnitt 1.4.4.) und der Wechselwirkung des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges mit dem p53-Signalweg (siehe Abschnitt 1.3.5.), stellte sich die Frage, ob die AhR und HIF-1 $\alpha$  nachgeschalteten ER $\alpha$ - und p53-Signalwege durch die gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie beeinflusst werden.

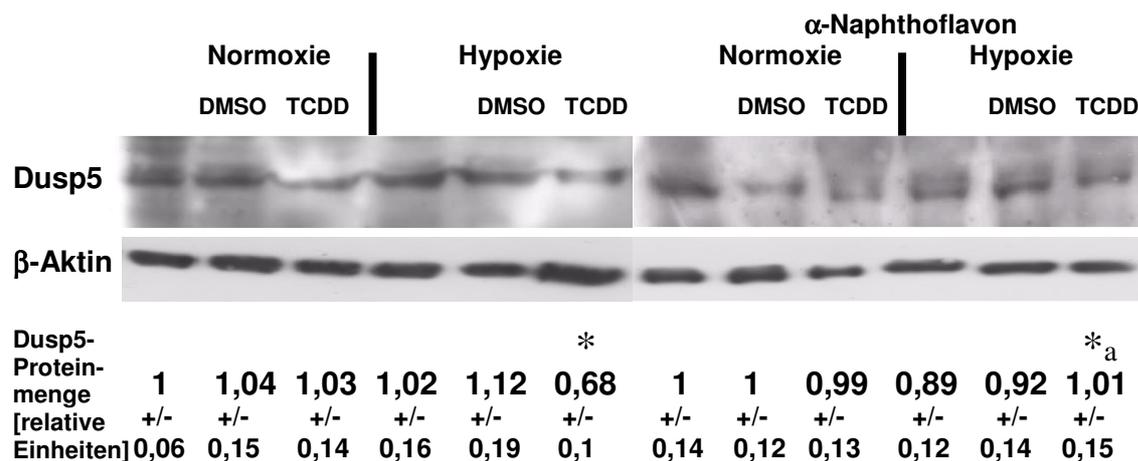
Eine gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie reduziert die endogene p53-Proteinmenge um ein Viertel (0,71, Abb. 3-9 A), während Einzelstimulation mit TCDD oder Hypoxie keine signifikanten Änderungen in der p53-Proteinmenge hervorrufen. Die Reduktion der p53-Proteinmenge kann durch die Behandlung mit ANF verhindert werden. Um zu überprüfen, ob die Reduktion der p53-Proteinmenge durch die E3-Ubiquitinligase Hdm2 verursacht wird, wurde die Hdm2-Transkriptmenge untersucht. Diese wurde durch Einzelstimulation mit TCDD 1,5-fach bzw. mit Hypoxie 1,4-fach und durch gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie 1,8-fach induziert (Abb. 3-9 B). ANF verhindert die TCDD-vermittelte Induktion der Hdm2-mRNA-Menge. Um zu klären, ob die Induktion der Hdm2-mRNA-Menge durch eine MAPK-vermittelte Transaktivierung des ER $\alpha$  (Bond *et al.* 2006; Bond *et al.* 2004) verursacht wird, wurde die spezifische MAPKK für ERK1/2 durch 50  $\mu$ M PD98059 inhibiert. PD98059 verändert die Hdm2-mRNA-Menge nach Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie nur leicht. Die p53-vermittelte Promotoraktivität wurde nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie um ein Viertel reduziert (Anhang Abschnitt 7.1.3. A).

A)



**Abb. 3-9: p53-Proteinmenge (A) und Hdm2-Transkriptmenge (B) in MCF-7-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. A) Die p53-Proteinmenge wurde zur  $\beta$ -Aktin-Proteinmenge normalisiert. B) Die Hdm2-mRNA-Menge wurde zur 18S-rRNA-Menge normalisiert. (\*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a  $p < 0,05$  im Vergleich mit der Hypoxie- und TCDD-vermittelten Reduktion, \*b  $p < 0,05$  im Vergleich zur TCDD Stimulation,  $n = 3$ )**

Als Konsequenz aus der Reduktion der p53-Proteinmenge und p53-vermittelten Promotoraktivität sollte die Expression der p53-Zielgene beeinflusst sein. Deshalb wurde die mRNA-Menge der p53-regulierten Proteine der Dual-spezifischen Phosphatase Familie (Wu *et al.* 2004) untersucht: MKP1 (*mitogen-activated protein kinase phosphatase 1*), PAC1 (*phosphatase activated in cells 1*) und DUSP5 (*dual specific protein phosphatase 5*). Nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie wurde die mRNA- und Proteinmenge des p53-Zielgens Dusp5 um die Hälfte bzw. um ein Viertel reduziert (Anhang Abschnitt 7.1.3. B, Abb. 3-10). Der AhR-spezifische Inhibitor ANF verhindert die beschriebenen Reduktionen in der p53-Proteinmenge und in der p53-Promotoraktivität sowie in der Dusp5-mRNA- und



**Abb. 3-10: Dusp5-Proteinmenge in MCF-7-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. Die Dusp5-Proteinmenge wurde zur β-Aktin-Proteinmenge normalisiert. (\* p < 0,05 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a p < 0,05 im Vergleich zur Hypoxie- und TCDD-vermittelten Reduktion, n = 3)**

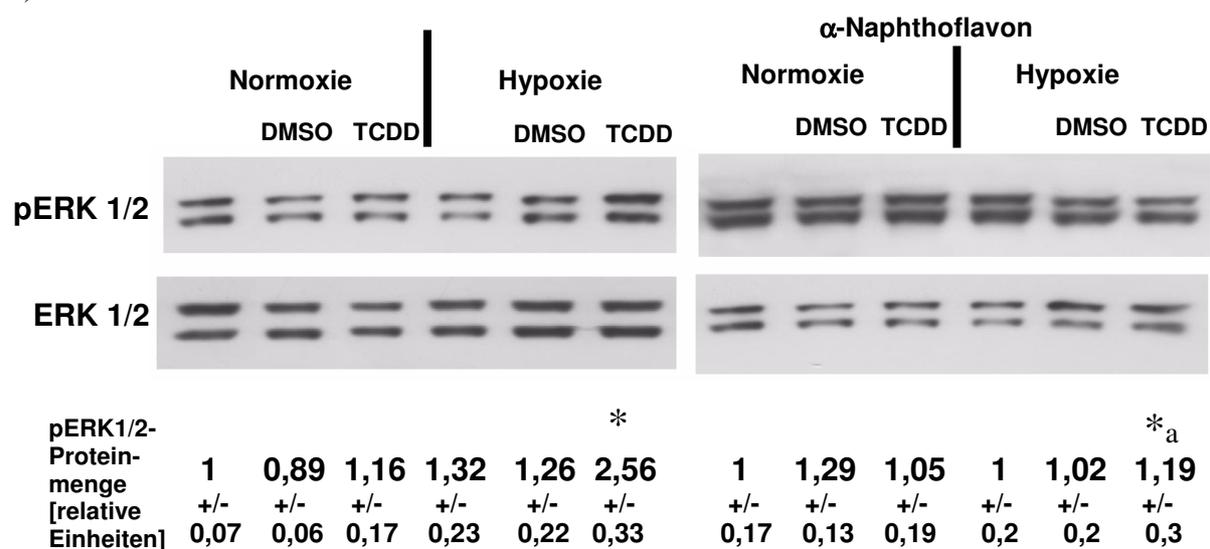
Proteinmenge. Die mRNA-Menge der beiden anderen p53-regulierten Phosphatasen PAC1 und MKP1 wurde ebenfalls mittels *Real-time* PCR untersucht. Diese Phosphatasen wurden durch gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie nicht verändert (siehe Anhang Abschnitt 7.1.3. C). Die Regulation von MKP1 und PAC1 durch andere Transkriptionsfaktoren könnte die fehlende Induktion der Transkription, trotz beobachteter Inhibierung der p53-Expression, erklären.

In der Literatur wurde Dusp5 bereits als negativer Regulator der MAPK-Signalwege beschrieben (Wu *et al.* 2004). Deshalb stellte sich die Frage, ob die Verringerung der Dusp5-Expression einen Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK1/2 hat. Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde mittels Western Blot untersucht. Als Kontrolle der ERK1/2-Phosphorylierung diente das ERK1/2-Gesamtprotein. Die ERK1/2-Phosphorylierung wurde nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie 2,5-fach induziert. ANF verhindert diese Erhöhung der ERK1/2-Phosphorylierung. Einzelstimulation mit TCDD oder Hypoxie erhöhen die ERK1/2-Phosphorylierung nicht (Abb. 3-11 A). Die semiquantitative Analyse der Phosphorylierung beider ERK-Proteine zeigte, dass ERK2 nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie höher phosphoryliert vorliegt als ERK1 (Anhang Abschnitt 7.1.3. D).

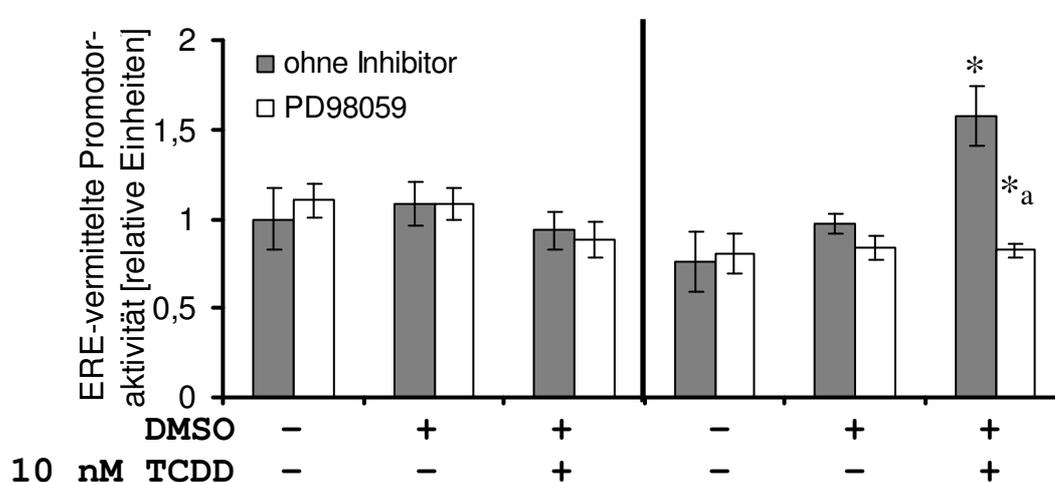
Die erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung könnte eine Transaktivierung des ERα verursachen (Pearce *et al.* 2004). Deshalb wurde die Regulation der ERE-vermittelten Promotoraktivität und die Induktion des ERα-Zielgenes SOCS3 (*Suppressor of cytokine signalling*), welches ein ERE enthält (Matthews *et al.* 2005), nach Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie in MCF-7-Zellen untersucht. Die ERE-vermittelte Promotoraktivität und die SOCS3-mRNA-Menge wurden nur bei gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie 1,6-fach induziert (Abb. 3-

11 B, 3-12 A). Die Induktion der ERE-vermittelten Promotoraktivität konnte durch den MEK-spezifischen Inhibitor PD98059 (50  $\mu$ M) verhindert werden (Abb. 3-11 B). Die Induktion der SOCS3-mRNA-Menge konnte durch den AhR-spezifischen Inhibitor ANF inhibiert werden. Die Einzelstimulationen mit TCDD oder Hypoxie verursachten keine signifikanten Änderungen (Abb. 3-12 A).

A)



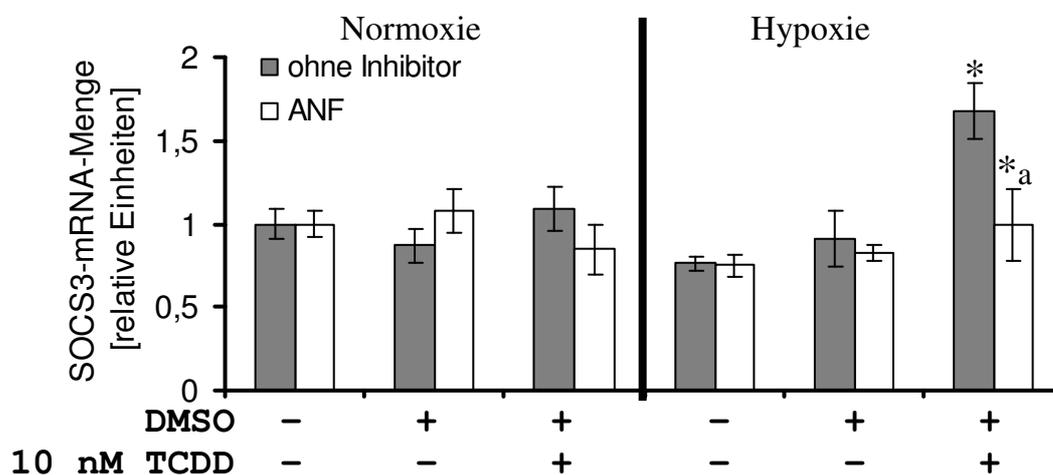
B)



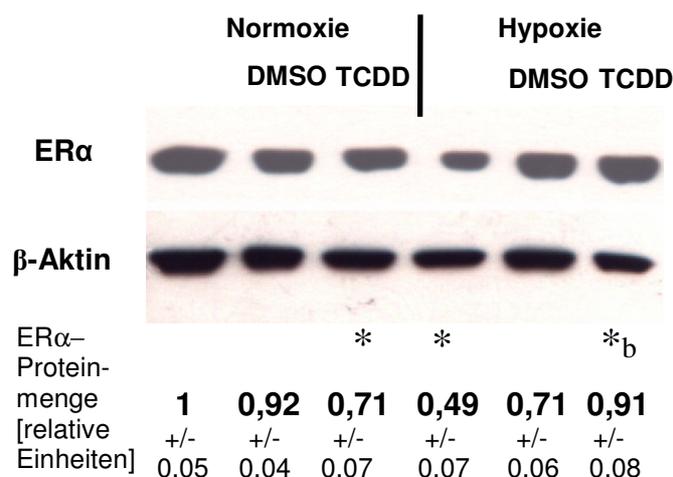
**Abb. 3-11: Phosphorylierung der Proteine ERK1/2 (A) und die ERE-Promotoraktivität (B) in MCF-7-Zellen nach Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. A) Die Phosphorylierung der ERK1/2-Proteine nach 6-stündiger Stimulation wurde mit einem Phospho-spezifischen ERK1/2-Antikörper detektiert. Die Proteinmenge wurde densitometrisch ausgewertet. Die pERK1/2-Proteinmenge wurde zur ERK1/2-Gesamtproteinmenge normalisiert. B) ERE-Promotoraktivität nach 24-stündiger Stimulation. Die Aktivität der Firefly-Luziferase wurde durch die Renilla-Luziferase-Aktivität normalisiert. (\*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a  $p < 0,05$  im Vergleich mit der Hypoxie und TCDD vermittelten Induktion,  $n = 3$ )**

Zusätzlich konnte ein Einfluss auf die endogene ER $\alpha$ -Proteinmenge detektiert werden. Im Vergleich zur normoxischen Kontrolle wurde die ER $\alpha$ -Proteinmenge durch Einzelstimulationen mit TCDD bzw. Hypoxie um ein Viertel bzw. um die Hälfte reduziert. Gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie inhibiert diese Reduktion (Abb. 3-12 B).

A)

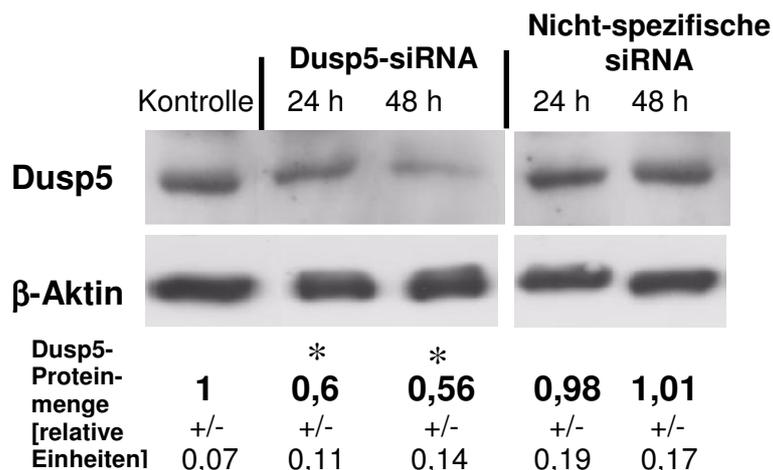


B)



**Abb. 3-12: Relative SOCS3-mRNA-Menge (A) und die ER $\alpha$ -Proteinmenge in MCF-7-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. A) Die SOCS3-mRNA-Menge wurde zur 18S-rRNA-Menge normalisiert. B) Die ER $\alpha$ -Proteinmenge wurde zur  $\beta$ -Aktin-Proteinmenge normalisiert. (\*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a  $p < 0,05$  im Vergleich mit der Hypoxie- und TCDD-vermittelten Induktion, \*b im Vergleich mit der Hypoxie oder TCDD-vermittelten Reduktion,  $n = 3$ )**

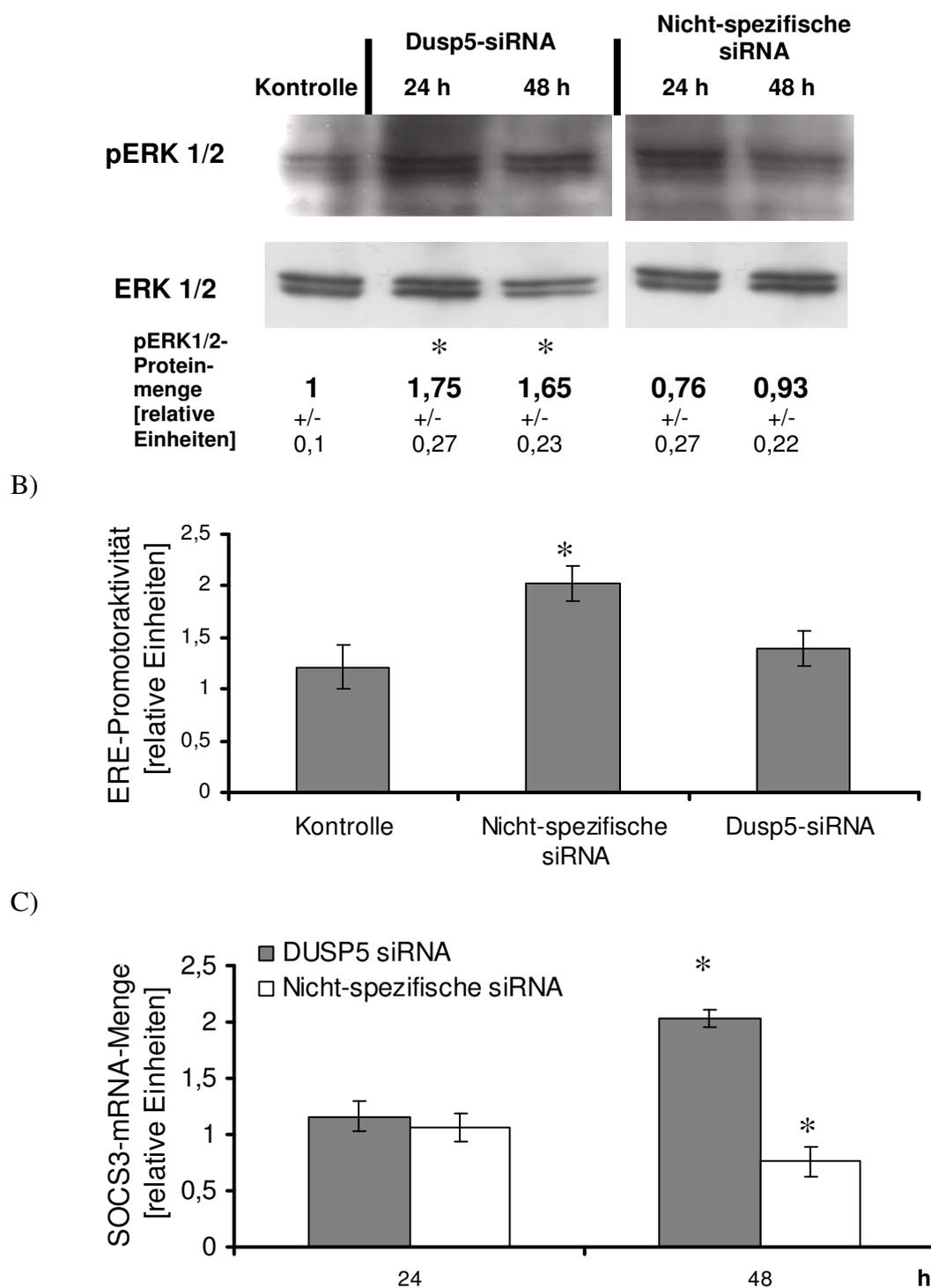
Die Inhibierung des p53-Signalweges, die reduzierte Expression von Dusp5, die erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 sowie die Aktivierung des ER $\alpha$ -Signalweges nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie lassen den Schluß zu, dass eine Verbindung zwischen allen drei Signalwegen existiert. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde die Expression des p53-Zielgenes Dusp5 in unstimulierten Zellen durch Einsatz einer spezifischen



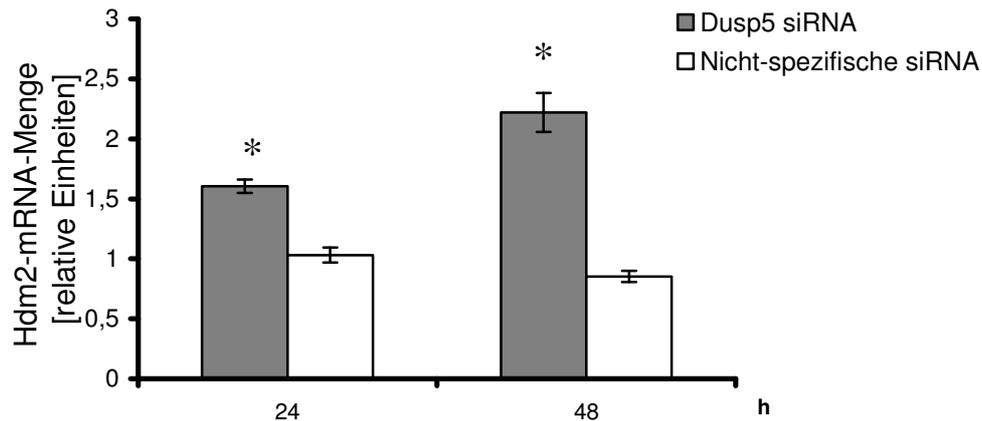
**Abb. 3-13: Dusp5-Proteinmenge in MCF-7-Zellen nach Behandlung mit einer nicht-spezifischen und einer spezifischen Dusp5-siRNA. Die Dusp5-Proteinmenge wurde zur  $\beta$ -Aktin-Proteinmenge normalisiert. (\*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle sowie zur nicht-spezifischen siRNA,  $n = 3$ )**

Dusp5-siRNA reprimiert. Dazu wurden MCF-7-Zellen mit einer spezifischen Dusp5- bzw. einer nicht-spezifischen siRNA transfiziert. Nach der Transfektion wurden die hervorgerufenen Änderungen nach 24 und 48 Stunden gemessen. Es zeigte sich, dass nach Dusp5-siRNA-Behandlung die Dusp5-mRNA- und Proteinmenge auf das 0,4-fache bzw. das 0,6-fache reduziert wurden. Die nicht-spezifische siRNA beeinflusst die Dusp5-Proteinmenge nach 24 und 48 Stunden im Vergleich zur nicht-transfizierten Kontrolle nicht (Abb. 3-13, Anhang Abschnitt 7.1.3. E). Die verringerte Dusp5-mRNA- und Proteinmenge resultiert in einer 1,8-fachen Erhöhung der ERK1/2-Phosphorylierung nach 24 und 48 Stunden, während die nicht-spezifische siRNA keine Veränderung der ERK1/2-Phosphorylierung bewirkte (Abb. 3-14 A). Die durch die Reduktion der Dusp5-Expression erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung verursachte eine 2-fache Erhöhung der ERE-vermittelten Promotoraktivität (Abb. 3-14 B). Zusätzlich wurde die Transkriptmenge der ER $\alpha$ -Zielgene SOCS3 und Hdm2 nach der Reduktion der Dusp5-Expression untersucht. Die Reduktion der Dusp5-Expression mittels siRNA verursacht eine 2-fache Induktion der SOCS3- und der Hdm2-mRNA-Menge nach 48 Stunden (Abb. 3-14 C, Abb. 3-15).

A)



**Abb. 3-14:** Die pERK1/2-Proteinmenge (A), die ERE-Promotoraktivität (B) und die SOCS3-mRNA-Menge (C) in MCF-7-Zellen nach Behandlung mit einer nicht-spezifischen und einer spezifischen Dusp5-siRNA. A) Die Phosphorylierung der ERK1/2-Proteine wurde mit einem Phospho-spezifischen ERK1/2-Antikörper detektiert. Die Proteinmenge wurde densitometrisch ausgewertet. Die pERK1/2-Proteinmenge wurde zur ERK1/2-Gesamtproteinmenge normalisiert. B) Die ERE-Promotoraktivität 24 h nach der siRNA-Transfektion. Die Aktivität der Firefly-Luziferase wurde durch die Renilla-Luziferase-Aktivität normalisiert. C) Die SOCS3-mRNA-Menge wurde zur 18S-rRNA-Menge normalisiert. (\*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle bzw. zur nicht-spezifischen siRNA,  $n = 3$ )



**Abb. 3-15: Die Hdm2-mRNA-Menge in MCF-7-Zellen nach Behandlung mit einer nicht-spezifischen und einer spezifischen Dusp5-siRNA. (\*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle bzw. zur nicht-spezifischen siRNA,  $n = 3$ )**

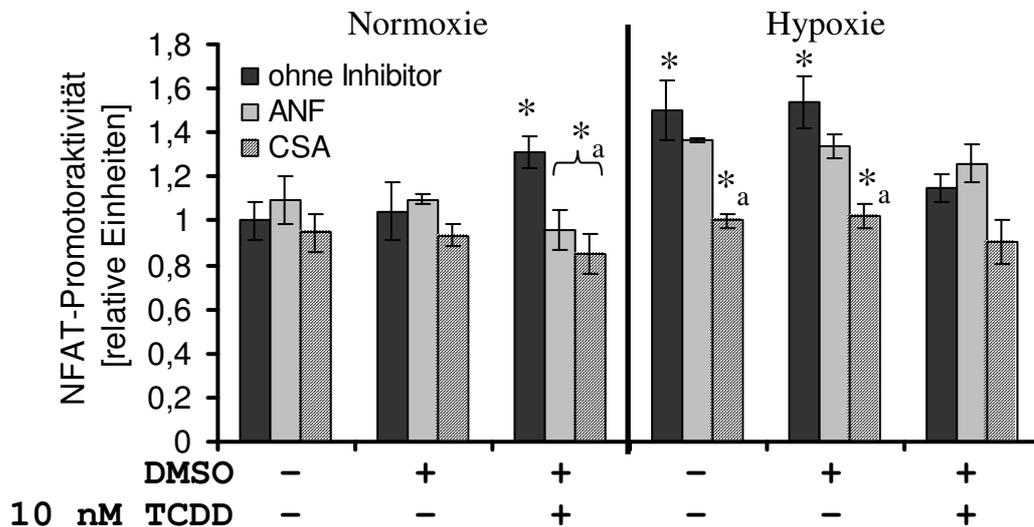
Durch die mittels siRNA hervorgerufene Reduktion der Dusp5-Expression wurde deutlich, dass die Reduktion der Dusp5-Expression, welche nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie aus der Inhibierung des p53-Signalweges resultiert, die Aktivierung des ER $\alpha$ -Signalweges verursacht.

### **3.6 Aktivierung des NFATc1-Signalweges nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie**

Ausgangspunkt der in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen zum NFAT-Signalweg waren die Daten einer Mikroarray-Analyse von MCF-7-Zellen, die unter Östrogen-reduzierten Bedingungen kultiviert worden waren. Der Transkriptionsfaktor NFATc2 war nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie reduziert exprimiert (Navarette Santos 2004, unveröffentlicht, Daten siehe Anhang Abschnitt 7.2). In dieser Arbeit zeigte sich, dass nach Kultivierung unter Östrogen-haltigen Bedingungen die NFATc2-mRNA-Menge nach Stimulation mit TCDD oder Hypoxie 2-fach reduziert war. Die gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie verursachten keine signifikante Änderung der NFATc2-mRNA im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die TCDD-vermittelte Reduktion der NFATc2-mRNA wurde durch ANF inhibiert. Weiterhin konnte die Reduktion der NFATc2-mRNA durch den Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A (CSA) verhindert werden (Anhang Abschnitt 7.1.4. A).

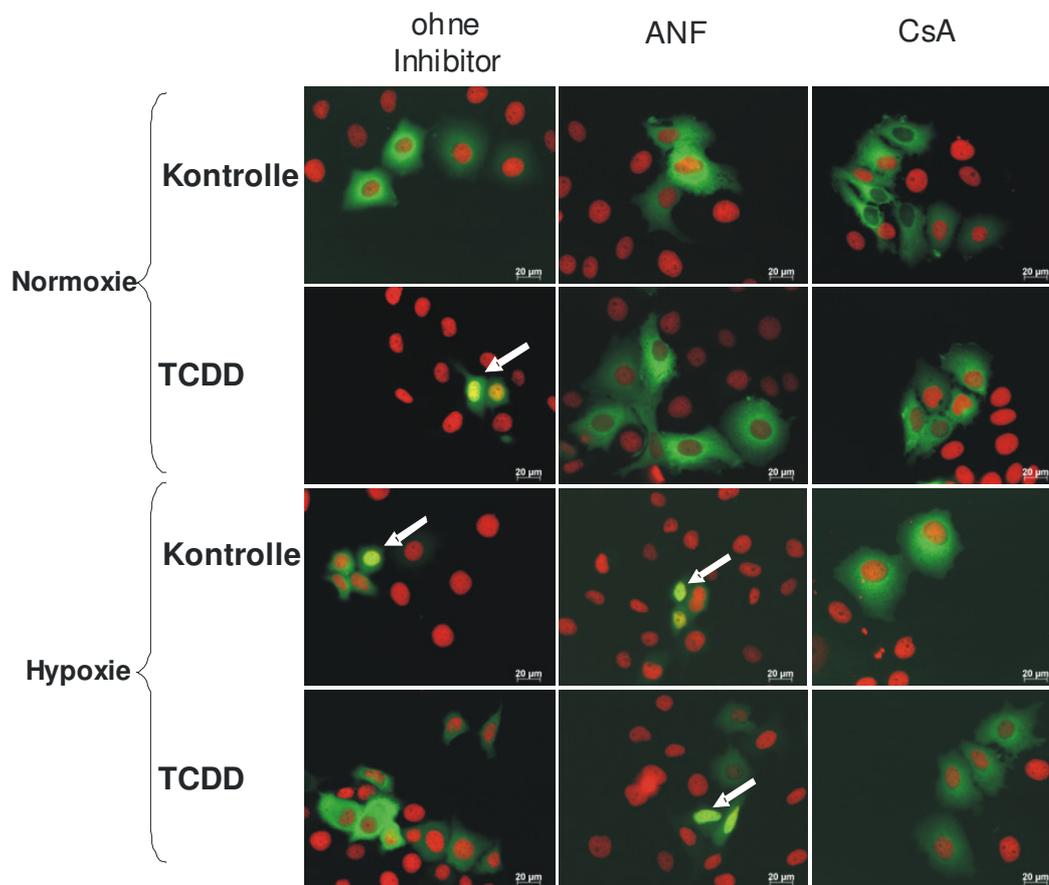
Um zu klären, ob die beobachteten Änderungen in der NFATc2-mRNA-Menge Auswirkungen auf die Aktivierung des NFAT-Signalweges haben, wurde die NFAT-vermittelte Promotoraktivität und die Lokalisation von NFAT in der Zelle untersucht. Die NFAT-Promotoraktivität wurde durch Einzelstimulation mit TCDD oder Hypoxie 1,4-fach bzw. 1,5-fach induziert. Eine gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie verursachte keine Änderungen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. ANF inhibiert die TCDD-vermittelte

Induktion der NFAT-Promotoraktivität. Der Calcineurin-Inhibitor CsA verhindert die Reduktion der Promotoraktivität nach Stimulation mit TCDD oder Hypoxie (Abb. 3-16). An diesen Beispielen wird erneut die Abhängigkeit der molekularen und zellulären Reaktion vom Expositionsmodus deutlich. Änderungen zeigen sich nur bei individueller Exposition und nicht bei gleichzeitiger Exposition mit TCDD und Hypoxie.



**Abb. 3-16:** NFAT-Promotoraktivität nach 24-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie in MCF-7-Zellen. Die Aktivität der Firefly-Luziferase wurde durch die Renilla-Luziferase-Aktivität normalisiert. (\*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a  $p < 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TCDD oder Hypoxie,  $n = 3$ )

Die Lokalisation von NFATc1 wurde mittels Immunfluoreszenz und Western Blot untersucht. Für die Untersuchung mittels Immunfluoreszenz wurde ein NFATc1-GFP-Fusionsprotein verwendet. NFATc1 ist strukturell und funktionell hoch homolog mit NFATc2 (Northrop *et al.* 1994). Das NFATc1-GFP-Fusionsprotein ist in den unstimulierten MCF-7-Zellen als grüne Fluoreszenz im Zytoplasma sichtbar (Abb. 3-17). Die Kerne wurden mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff 7-AAD angefärbt. Nach 6-stündiger Stimulation mit 10 nM TCDD oder Hypoxie ist der NFATc1 im Kern lokalisiert. Dies ist anhand der Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenz in den Kernen ersichtlich. Nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie wurde keine Translokation von NFATc1 detektiert. Die Translokation von NFATc1 wurde nach Stimulation mit TCDD oder Hypoxie durch den Calcineurin-Inhibitor CsA verhindert. ANF inhibierte die TCDD-vermittelte Translokation. Außerdem wurde durch den Einsatz von ANF bei gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie der NFATc1-Kernimport wieder ermöglicht (Abb. 3-17). Die Lokalisation von NFATc1 wurde zusätzlich mittels Fraktionierung von MCF-7-Zellen und anschließendem Western Blot bestätigt.



**Abb. 3-17: Lokalisation von NFATc1 in MCF-7-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. n = 3**

Aufgrund der Dephosphorylierung des im Zytoplasma lokalisierten, mehrfach phosphorylierten NFATc1 durch das Protein Calcineurin können in der Kernfraktion nach der Western Blot-Analyse mehrere NFATc1-Proteinbanden detektiert werden (Abb. 3-18 A). Diese Proteinbanden entsprechen den verschiedenen stark phosphorylierten NFATc1-Proteinen. Nach Stimulation mit TCDD oder Hypoxie - jedoch nicht nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie - konnte eine erhöhte NFATc1- Proteinmenge in der Kernfraktion von MCF-7-Zellen gezeigt werden. Eine geringe Erhöhung der NFATc1-Proteinmenge wurde in der DMSO-Kontrolle unter normoxischen Bedingungen gefunden. Nach der Inhibierung mit CsA waren nur noch sehr geringe Mengen NFATc1 in der Kernfraktion der MCF-7-Zellen zu beobachten (Abb. 3-18 A).

Die mRNA-Menge und die Aktivität des NFAT-regulierten Zielgenes Autotaxin wurde mittels *Real-time* PCR und Messung der Cholin-Bildung in MCF-7-Zellen bestimmt. Die ATX-mRNA-Menge wurde durch TCDD auf 50 fg in 1 µg totale RNA erhöht. Hypoxie erhöhte die absolute ATX-mRNA-Menge auf 60 fg. Eine gleichzeitige Stimulation mit TCDD

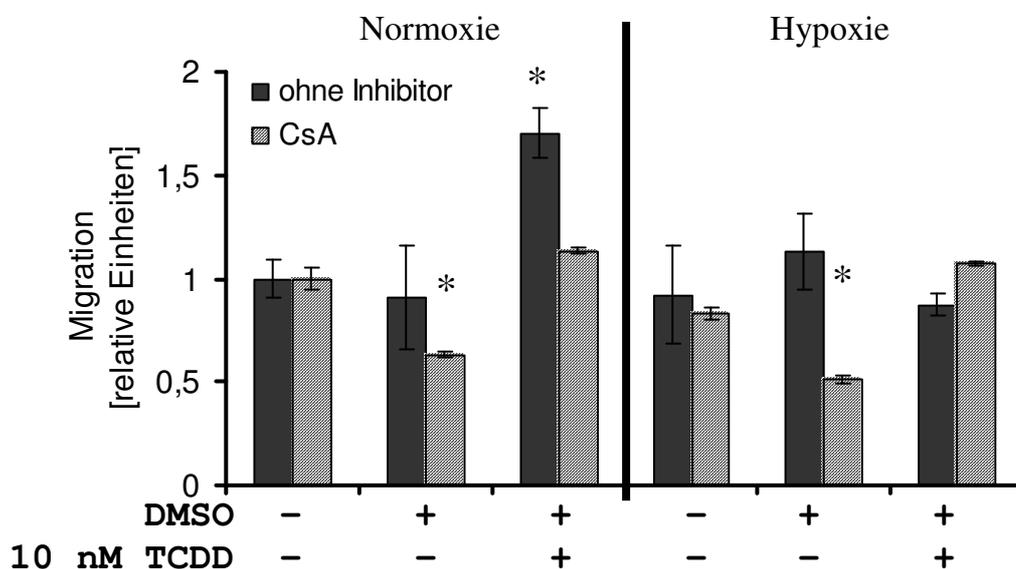
A)



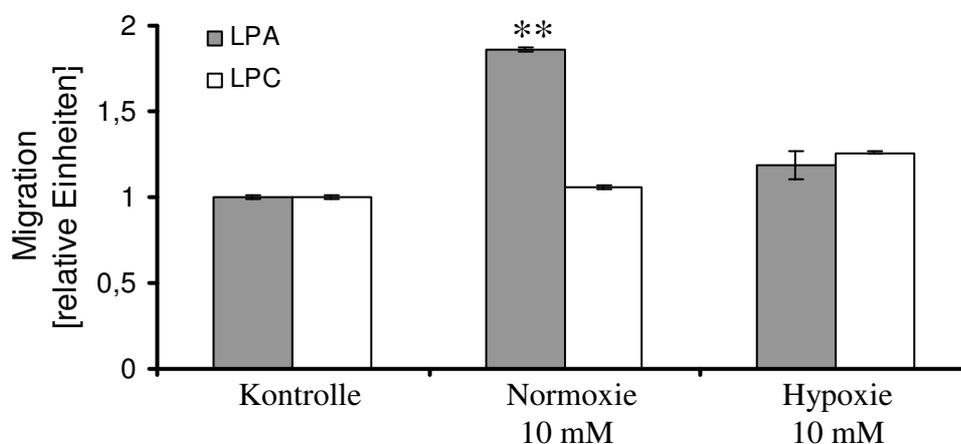
Calcineurin-Inhibitor CsA verursachten keine signifikanten Änderungen in der ATX-mRNA-Menge (Anhang Abschnitt 7.1.4. B).

Die Cholin-Bildung, verursacht durch die ATX Lysophospholipase D-Aktivität, wurde durch TCDD auf 8,5  $\mu$ M Cholin erhöht. Hypoxie steigerte die Cholin-Bildung auf 9,5  $\mu$ M. Eine gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie reduzierte die ATX-vermittelte Cholin-Bildung auf 6  $\mu$ M. Diese Konzentration entspricht etwa der Cholin-Bildung in unstimulierten MCF-7-Zellen. ANF inhibierte die TCDD-induzierten Effekte auf die ATX-Aktivität unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen. Ein Einfluss von ANF auf die Cholin-Bildung konnte im Gegensatz zu veränderten ATX-mRNA-Mengen nicht beobachtet werden. Der Calcineurin-Inhibitor CsA inhibierte alle durch Hypoxie und TCDD hervorgerufenen Veränderungen der ATX-Aktivität (Abb. 3-18 B).

A)



B)



**Abb. 3-19: Migration von MCF-7-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie (A) bzw. nach 24-stündiger Stimulation mit den ATX-Substrat LPA oder dem Enzymprodukt LPC (B). (\*  $p < 0,05$  oder \*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle,  $n = 3$ )**

Autotaxin stimuliert die ungerichtete und gerichtete Migration von Brustkrebszellen (Chen *et al.* 2005; Jauliac *et al.* 2002; Yiu *et al.* 2006). Aufgrund dieser Literaturdaten und der in der vorliegenden Arbeit detektierten TCDD- oder Hypoxie-induzierten Aktivierung des NFAT-Signalweges sowie der Induktion des Zielgenes ATX stellte sich die Frage, ob die Migration der MCF-7-Zellen nach Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie verändert wird. Die Migration der MCF-7-Zellen wurde durch die Wanderung der Zellen durch eine poröse Membran in einem Transwellsystem beobachtet. Durch die Stimulation mit TCDD wurde die Migration um das 1,7-fache erhöht. Hypoxie sowie gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie verändert die Migration der MCF-7-Zellen nicht. Der Calcineurin-Inhibitor CsA inhibierte die TCDD-vermittelten Effekte auf die Migration, verringert jedoch ebenso die Migration in DMSO-behandelten MCF-7-Zellen um die Hälfte (Abb. 3-21 A). Der AhR-spezifische Inhibitor ANF verstärkte sowohl unter normoxischen (DMSO-Kontrolle) als auch hypoxischen Bedingungen (unstimulierte Kontrolle und DMSO-Kontrolle) die Migration. Außerdem konnte kein inhibierender Einfluss von ANF auf die TCDD-induzierte Migration festgestellt werden. Die beobachteten ANF-vermittelten Effekte korrelieren nicht mit den gemessenen ATX-Enzymaktivitäten (Anhang Abschnitt 7.6.4).

Die beobachteten Auswirkungen auf die Migration von MCF-7-Zellen wurden mit der Migration nach Stimulation mit dem ATX-Substrat (LPC) und Enzymprodukt (LPA) korreliert, um ATX-spezifische Effekte erkennen zu können. Die Migration wurde spezifisch durch 10  $\mu$ M LPA (Lysophosphatidylsäure), jedoch nicht 10  $\mu$ M LPC (Lysophosphatidylcholin), unter normoxischen Bedingungen 1,8-fach induziert. Unter hypoxischen Bedingungen konnte weder durch LPA noch durch LPC eine Erhöhung der Migration der MCF-7-Zellen detektiert werden (Abb. 3-21 B).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Einzelstimulation mit TCDD oder Hypoxie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFATc1 induzierte. Diese Aktivierung resultierte in der Induktion der Expression und Aktivität des NFAT-Zielgenes ATX. TCDD induzierte weiterhin die Migration von MCF-7-Zellen über das enzymatische Produkt von Autotaxin, LPA, unter normoxischen Bedingungen. Hypoxie dagegen induzierte die ATX Aktivität allerdings nicht die Migration der MCF-7-Zellen. Eine gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie führte dagegen nicht zur Aktivierung des NFATc1-Signalweges.

### **3.7 Expression von PHD2 – Ist PHD2 der Mediator der Interferenz?**

Die in diesem Abschnitt aufgeführten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Seifert *et al.* 2007). In den Abschnitten 3.1. bis 3.4. wurde die Interferenz zwischen dem AhR und HIF-1 $\alpha$  in MCF-7- sowie in HepG2-Zellen gezeigt. Im Abschnitt 1.3.2 und 1.3.3. wurde beschrieben, dass die Aktivierung des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges durch die PHD-vermittelte Hydroxylierung

und anschließende Ubiquitylierung inhibiert wird. Aufgrund dieser Daten stellte sich die Frage, ob nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie PHD2 der Mediator der TCDD-vermittelten Reduktion der HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung ist. In diesem Falle würde eine zusätzliche Induktion der PHD2-Expression nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie im Vergleich zur Induktion unter hypoxischen Bedingungen gemessen werden können. Deshalb wurden die absolute PHD2-mRNA-Menge, die PHD2-Promotoraktivität und die PHD2-Proteinmenge in MCF-7- und HepG2-Zellen untersucht. In der Zelllinie HepG2 wurden in der Vergangenheit insbesondere Studien zur HIF-1 $\alpha$ - und PHD-Regulierung durchgeführt. Um eine Induktion und damit einen möglichen Einfluss der beiden anderen PHD-Isoformen auf die HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung auszuschließen, wurde die PHD1- und PHD3-mRNA-Menge mittels *Real-time* PCR untersucht.

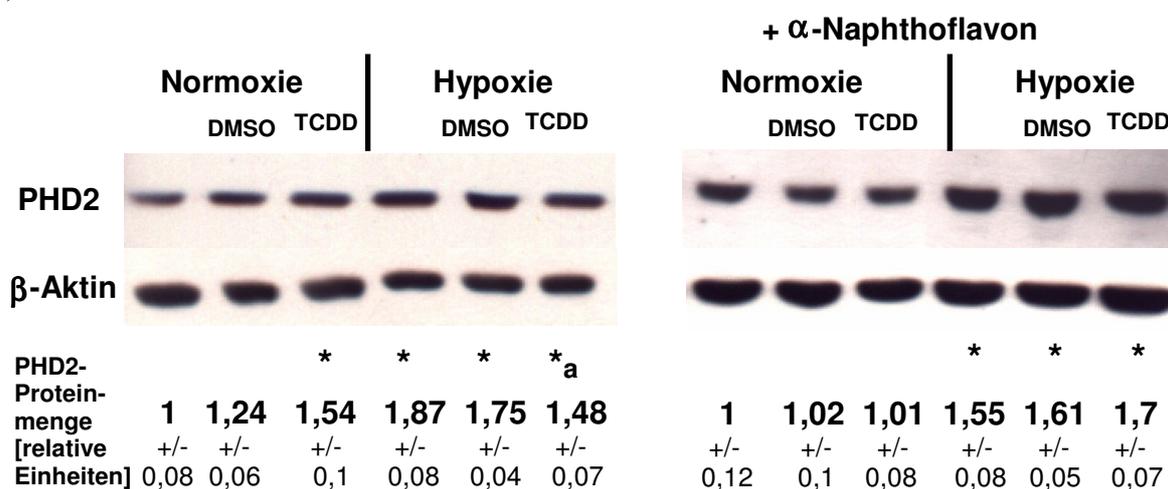
Die PHD2-mRNA-Menge wurde durch TCDD unter normoxischen Bedingungen auf etwa 80.000 Kopien in MCF-7-Zellen bzw. 5.000 Kopien in HepG2-Zellen erhöht. Hypoxie induzierte die PHD2-mRNA-Menge auf 120.000 Kopien in MCF-7- bzw. 5.000 Kopien in HepG2-Zellen. Eine gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie reduzierte die hypoxische Induktion der PHD2-mRNA-Menge auf 8.000 Kopien in MCF-7-Zellen bzw. 2.500 Kopien in HepG2-Zellen. Der Einsatz von ANF hatte unter normoxischen Bedingungen eine Erhöhung der PHD2-mRNA-Menge in MCF-7-Zellen zur Folge. ANF inhibierte die TCDD-vermittelte Induktion der PHD2-mRNA-Menge auf 10.000 Kopien in MCF-7-Zellen bzw. 2.000 Kopien in HepG2-Zellen. Diese PHD2-Transkriptmenge ist vergleichbar mit der Expression in der unstimulierten bzw. DMSO-behandelten Kontrolle. Durch Zugabe von ANF nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie wurde die PHD2-mRNA-Menge auf die Kopienzahl der hypoxischen DMSO-Kontrolle erhöht (Anhang Abschnitt 7.1.5. A, B). Die PHD1- bzw. PHD3-Transkriptmenge wurden im Vergleich zu PHD2 durch TCDD und/oder Hypoxie in ähnlicher Weise reguliert (Anhang Abschnitt 7.1.5. C, D).

Die PHD2-Proteinmenge wurde durch TCDD oder Hypoxie 1,5-fach bzw. 1,9-fach induziert in MCF-7- und HepG2-Zellen. Eine gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie reduzierte die Hypoxie-vermittelte Induktion auf 1,5-fach in MCF-7-Zellen bzw. auf 1,6-fach in HepG2-Zellen. Eine Inhibierung mit ANF verhinderte diese Reduktion in der PHD2-Proteinmenge (siehe Abb. 3-20 A, Anhang Abschnitt 7.1.5. E).

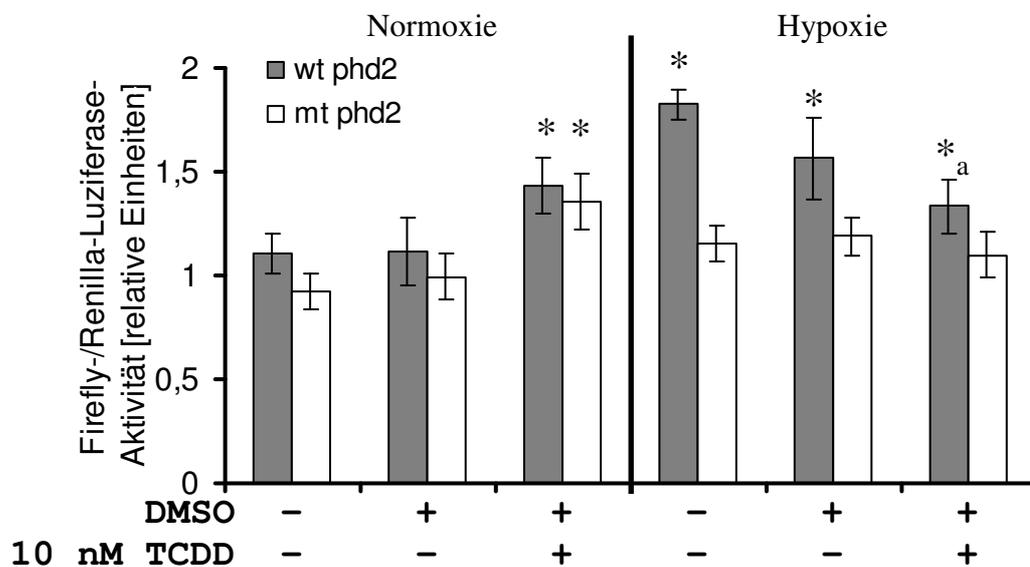
Um zu überprüfen, ob die beschriebenen Änderungen in der absoluten PHD2-mRNA-Menge bzw. der PHD2-Proteinmenge auf eine HIF-1 $\alpha$ -vermittelte Regulation zurückzuführen sind, wurde die Aktivität des PHD2-Promotors in MCF-7-Zellen untersucht. Dazu wurde der GC-reiche Teil des PHD2-Promotors mit einem funktionellen HRE verwendet (Metzen *et al.* 2005). Der gleiche Promotor, allerdings mit einem mutierten, nichtfunktionellen HRE, wurde

zum Vergleich mitgeführt. Die Aktivität des Wildtyp-Promotors wurde durch TCDD 1,5-fach bzw. durch Hypoxie 1,8-fach induziert. Die gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie reduziert die hypoxische Induktion der Wildtyp-PHD2-Promotoraktivität. Die Aktivität des mutierten PHD2-Promotors zeigte dagegen keine signifikanten Veränderungen nach Stimulation mit Hypoxie oder gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie. Die Aktivität des PHD2-Promotors wurde durch TCDD signifikant induziert (vgl. Abb. 3-20 B).

A)



B)



**Abb. 3-20:** TCDD und Hypoxie beeinflussen die PHD2-Proteinmenge (A) und die PHD2-Promotoraktivität (B) in MCF-7-Zellen. A) Die PHD2-Proteinmenge nach 6-stündiger Stimulation. Die PHD2-Proteinmenge wurde zur  $\beta$ -Aktin-Proteinmenge normalisiert. B) Die Aktivität des Wildtyp (wt)-PHD2-Promotorkonstruktes bzw. des HRE-mutierten (mt) Promotorkonstruktes nach 24-stündiger Stimulation. (\*  $p < 0.05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a  $p < 0.05$  im Vergleich zur hypoxischen Induktion,  $n = 3$ )

Die in diesem Abschnitt aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass keine zusätzliche Induktion der PHD2-Expression nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie erfolgte. Um eine

Induktion der PHD2-Expression innerhalb der 6 Stunden Versuchszeit und damit einen Einfluss auf die HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung auszuschließen, wurde die PHD2-Proteinmenge in dem Zeitraum von Beginn der Stimulation bis 6 Stunden nach der Stimulation in MCF-7- und HepG2-Zellen untersucht (Anhang Abschnitt 7.1.5. F). Auch während dieser Zeitspanne wurde keine zusätzliche Induktion der PHD2-Proteinmenge nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie gemessen.

Außerdem besteht die Möglichkeit, dass zusätzlich zur Regulation der PHD2-Expression eine erhöhte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) die Aktivität der PHD2 erhöht und eine verstärkte Hydroxylierung von HIF-1 $\alpha$  ermöglicht. Aus diesem Grund wurde die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in MCF-7- und HepG2-Zellen mit Hilfe des Detektionsreagenz H<sub>2</sub>DCFDA und der Durchflußzytometrie untersucht. In HepG2-Zellen wurde die Bildung von ROS durch TCDD und/oder Hypoxie etwa 1,4-fach induziert. In MCF-7-Zellen wurde keine Änderung der ROS-Bildung beobachtet (Anhang Abschnitt 7.1.5. G).

Aus den bisher vorgestellten Daten ist ersichtlich, dass die PHD2 unter normoxischen Bedingungen AhR-abhängig induziert wurde. Diese AhR-abhängige Regulation der PHD2-Expression wurde jedoch unter hypoxischen Bedingungen dominiert durch die HIF-1 $\alpha$ -abhängige Reduktion der PHD2-Expression, die durch die TCDD-vermittelte HIF-1 $\alpha$ -Destabilisierung vermittelt wird. Aufgrund der reduzierten PHD2-Expression sowie durch die nicht zusätzlich erhöhte Bildung von ROS nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie wurde PHD2 als Mediator der Interferenz zwischen dem AhR und dem HIF-1 $\alpha$  ausgeschlossen.

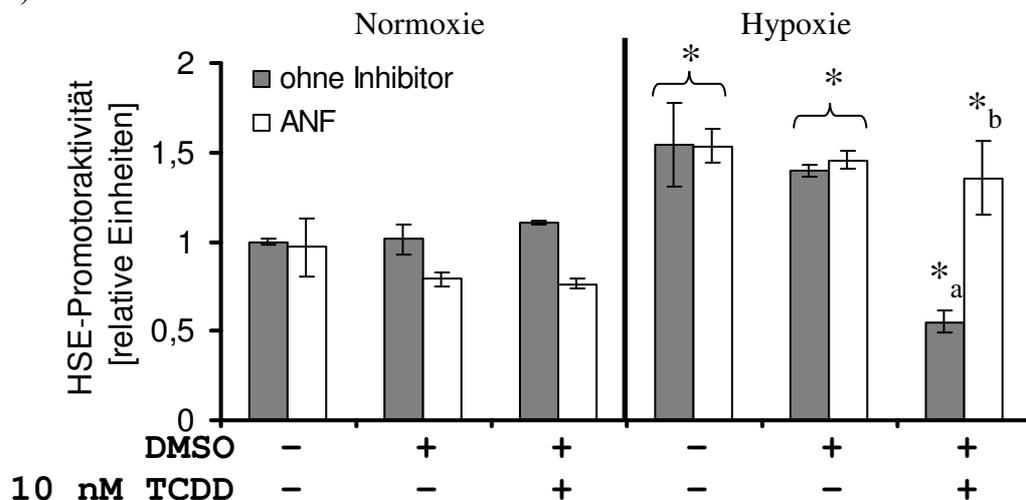
### **3.8 Expression von Hsp90 and Rack1 – Sind beide Proteine Mediatoren der Interferenz?**

In den Abschnitten 3.1 bis 3.4 wurde die Interferenz zwischen dem AhR und HIF-1 $\alpha$  in MCF-7- sowie in HepG2-Zellen beschrieben. Im Abschnitt 3.7 wurde der Hauptregulator der HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung, PHD2, als Mediator der Interferenz ausgeschlossen. Aus diesen Untersuchungen ergab sich die Frage, welches Protein der Mediator der Interferenz beider Signalwege sein könnte. Das Chaperon Hsp90 (Hitzeschockprotein 90) kann an die PAS-B Domäne von HIF-1 $\alpha$  binden. Hsp90 stabilisiert HIF-1 $\alpha$  und verhindert gleichzeitig den nicht-spezifischen Abbau dieses Proteins (Katschinski *et al.* 2004).

Es wurde die Regulation der Hsp90-Expression und der HSE- (Hitzeschock-Response-Element) Promotoraktivität untersucht. Die HSE-Promotoraktivität wurde durch Einzelstimulation mit TCDD oder Hypoxie auf das 1,5-fache induziert. Eine gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie reduzierte die Promotoraktivität auf etwa ein Drittel.

Durch den Einsatz von ANF wurde die Reduktion der HSE-Promotoraktivität nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie verhindert (Abb. 3-21 A).

A)



B)

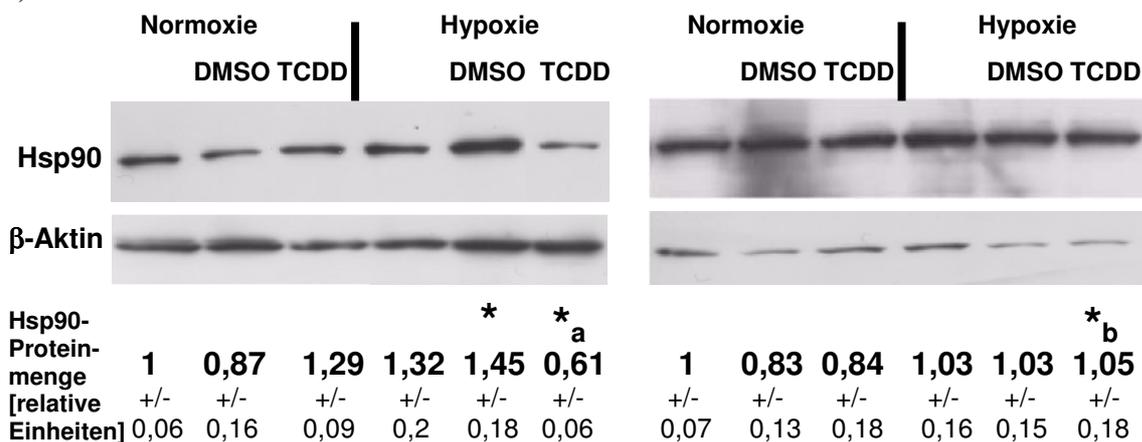


Abb. 3-21: Die HSE-Promotoraktivität (A) und die Hsp90-Proteinmenge (B) nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie in MCF-7-Zellen. A) Die HSE-Promotoraktivität nach 24-stündiger Stimulation. Die Aktivität der *Firefly*-Luziferase wurde durch die *Renilla*-Luziferase-Aktivität normalisiert. B) Die Hsp90-Proteinmenge nach 6-stündiger Stimulation. Die Hsp90-Proteinmenge wurde zur  $\beta$ -Aktin-Proteinmenge normalisiert. (\*  $p < 0.05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a  $p < 0.05$  im Vergleich zur hypoxischen Induktion, \*b  $p < 0.05$  im Vergleich zur Stimulation mit TCDD und Hypoxie, n = 3)

Die Hsp90-mRNA-Menge bzw. Hsp90-Proteinmenge wurde durch TCDD oder Hypoxie auf das 1,5-fache bzw. das 1,3-fache induziert, während nach gleichzeitiger Stimulation die Hsp90-mRNA-Menge bzw. Proteinmenge auf Zweifünftel bzw. Dreifünftel des ursprünglichen Wertes reduziert wurden. Durch den AhR-spezifischen Inhibitor ANF wurde diese Reduktion nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie verhindert (Abb. 3-21 B, Anhang Abschnitt 7.1.6. A).

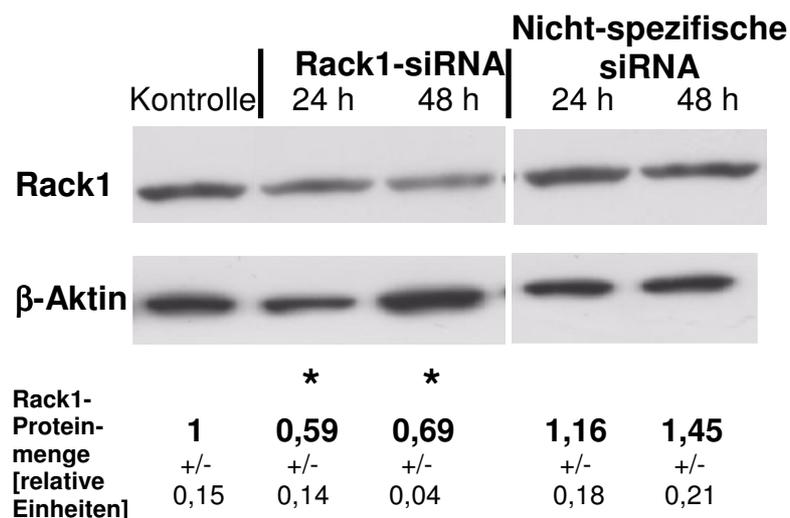
In einer 2007 veröffentlichten Studie (Liu *et al.* 2007) wurde nach Inhibierung von Hsp90 durch den Inhibitor 17-Allylaminogeldanamycin der Sauerstoff-PHD-VHL-unabhängige Abbau von HIF-1 $\alpha$  über das Protein Rack1 (*receptor of activated C-kinase 1*) beschrieben. Dabei wurde von den Autoren die Konkurrenz von Hsp90 und Rack1 um die PAS-A-Bindestelle in HIF-1 $\alpha$  vorgeschlagen.

Aus diesen Literaturdaten und der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Reduktion der Hsp90-Expression nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie ergab sich die Frage, ob die Konkurrenz zwischen Hsp90 und Rack1 um das Protein HIF-1 $\alpha$  der Mediator der TCDD-vermittelten Reduktion der HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung sein könnte. Um dies zu klären, wurde zunächst die Rack1-mRNA-Menge in MCF-7-Zellen untersucht. Die Rack1-Transkriptmenge wurde weder durch Einzelstimulation mit TCDD oder Hypoxie noch durch gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie signifikant verändert (Anhang Abschnitt 7.1.6. B).

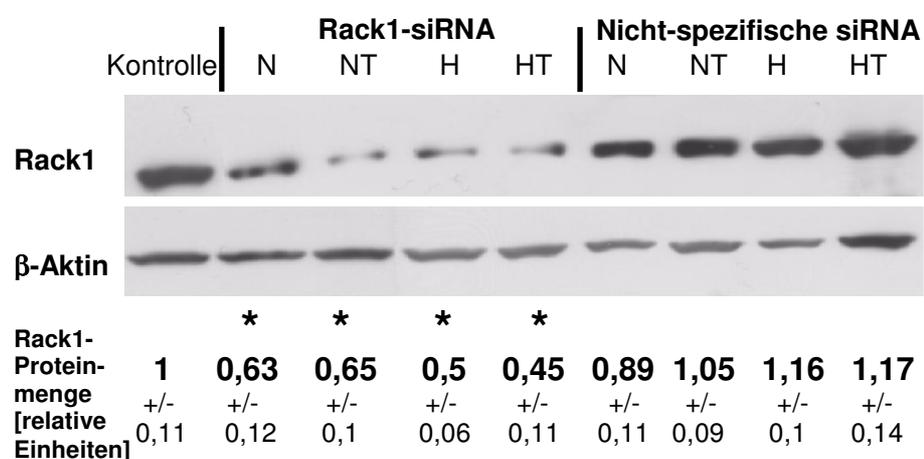
Um die Konkurrenz von Hsp90 und Rack1 um HIF-1 $\alpha$  nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie zu bestätigen, wurde zusätzlich die Rack1-Expression mit Hilfe einer spezifischen siRNA inhibiert. Dazu wurden MCF-7-Zellen mit der spezifischen Rack1 bzw. der nicht-spezifischen siRNA transfiziert. Die hervorgerufenen Änderungen wurden nach 24 bis 48 Stunden gemessen. In Abbildung 3-22 A wird gezeigt, dass die Rack1-siRNA die Rack1-Proteinmenge auf den Wert 0,6 bzw. 0,7 nach 24 bzw. 48 Stunden reduzierte. Die nicht-spezifische siRNA beeinflusste die Rack1-Proteinmenge nach 24 bis 48 Stunden im Vergleich zur nicht-transfizierten Kontrolle nicht signifikant.

Weiterhin wurde die Rack1-Proteinexpression nach siRNA-Behandlung sowie Stimulation mit TCDD und Hypoxie untersucht. Die Rack1-siRNA reduzierte die Rack1-Proteinmenge auf den Wert 0,7 nach TCDD Stimulation. Das gleiche Ergebnis zeigte die unstimulierte Kontrolle. Die Rack1-Proteinmenge wurde durch die Rack1-siRNA und zusätzlicher Stimulation mit Hypoxie oder gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie um die Hälfte reduziert. Die nicht-spezifische siRNA beeinflusste die Rack1-Proteinmenge nach Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie im Vergleich zur nicht-transfizierten Kontrolle nicht signifikant (Abb. 3-22 B).

A)



B)



**Abb. 3-22: Rack1-Proteinmenge in MCF-7-Zellen nach der Transfektion einer nicht-spezifischen und einer spezifischen Rack1-siRNA. A) Die Rack1-Proteinmenge nach siRNA-Transfektion (n = 3). B) 48 Stunden nach der siRNA-Transfektion erfolgte eine 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. Die Rack1-Proteinmenge wurde zur β-Aktin-Proteinmenge normalisiert (n = 2). (\* p < 0,05 im Vergleich zur nicht-transfizierten Kontrolle sowie zur nicht-spezifischen siRNA)**

Abschließend wurden die Auswirkungen der Rack1-Inhibierung auf die HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung und die transkriptionelle Aktivität untersucht. Um die Reporter-gen-Untersuchungen durchzuführen, wurden die Zellen mit einem HRE-Reporter-gen-konstrukt sowie der Rack1-spezifischen bzw. der nicht-spezifischen siRNA transfiziert und 24 h nach Transfektion für weitere 24 Stunden stimuliert. Unter hypoxischen Bedingungen wurde eine 5-fache bzw. 4-fache Induktion der HRE-vermittelten Promotoraktivität nach Transfektion mit der Rack1-spezifischen bzw. der nicht-spezifischen siRNA beobachtet. TCDD verringerte bei gleichzeitiger Stimulation mit Hypoxie die Hypoxie-induzierte Erhöhung der HRE-vermittelten

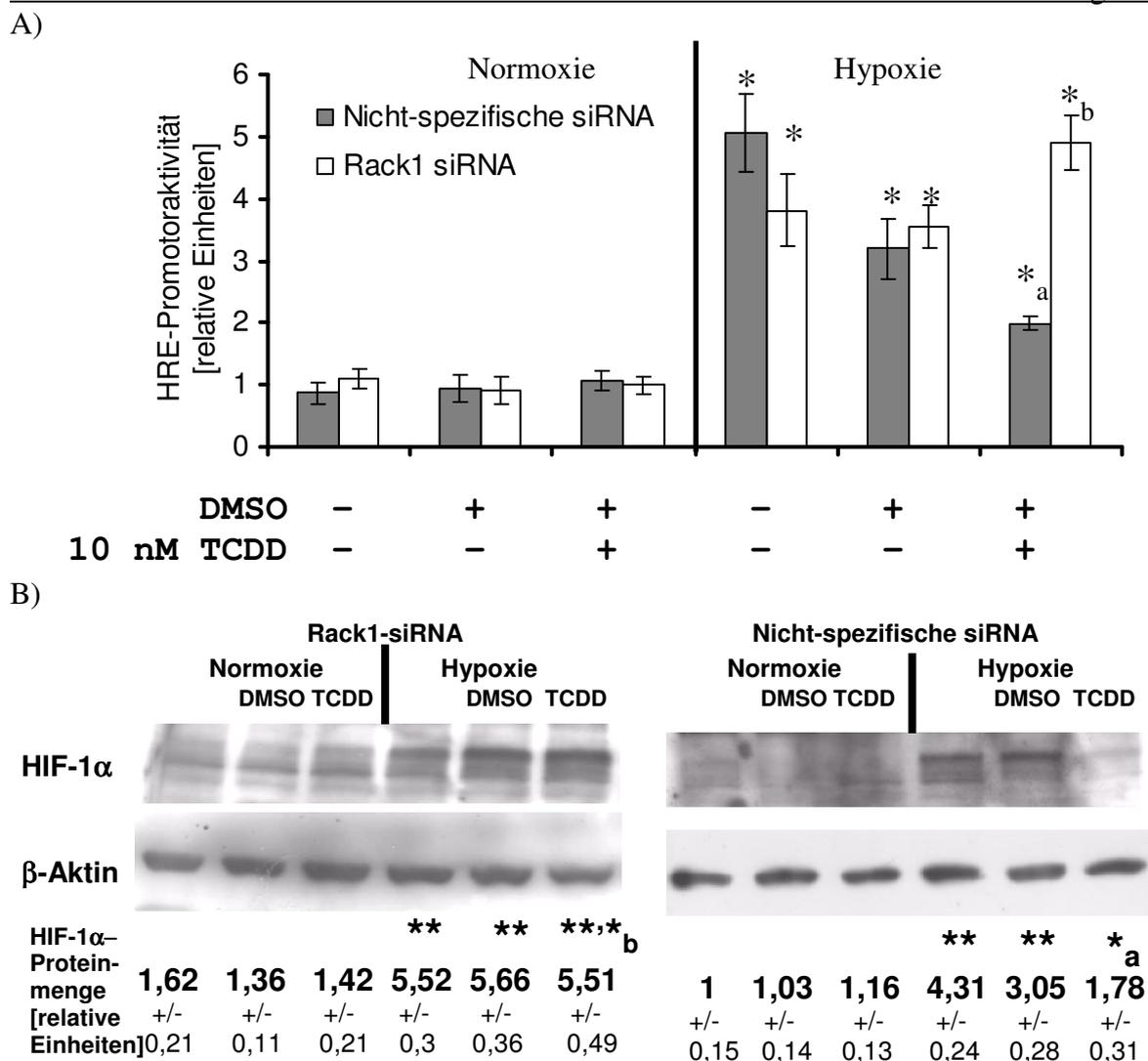


Abb. 3-23: HRE-Promotoraktivität (A) und HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung (B) in MCF-7-Zellen nach Transfektion mit einer nicht-spezifischen und einer Rack1-spezifischen siRNA. A) 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 Stunden mit TCDD und Hypoxie stimuliert. Die Aktivität der *Firefly*-Luziferase wurde durch die *Renilla*-Luziferase-Aktivität normalisiert (n = 3). B) 48 Stunden nach der siRNA-Transfektion erfolgte eine 6-stündige Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. Die HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge wurde zur  $\beta$ -Aktin-Proteinmenge normalisiert (n = 3). (\*\* p<0.001 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a p<0.05 im Vergleich zur hypoxischen Induktion, \*b p<0,05 im Vergleich zur Stimulation mit der nicht-spezifischen siRNA sowie TCDD und Hypoxie)

Promotoraktivität auf das 2-fache. Die Rack1-spezifische siRNA verhinderte diese TCDD-vermittelte Reduktion der HRE-vermittelten Promotoraktivität (Abb. 3-23 A).

Die HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung nach siRNA-Behandlung und Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie wurde im Western Blot untersucht. Nach Behandlung der MCF-7-Zellen mit der Rack1-spezifischen bzw. der nicht-spezifischen siRNA wurde eine 5-fach bzw. 4-fach erhöhte Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  unter hypoxischen Bedingungen detektiert. Die Transfektion mit der Rack1-spezifische siRNA verhinderte die TCDD-vermittelte Reduktion der HIF-1 $\alpha$ -

Stabilisierung unter hypoxischen Bedingungen. Die nicht-spezifische siRNA konnte dagegen die TCDD-vermittelte Reduktion der HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung unter hypoxischen Bedingungen nicht verhindern (Abb. 3-23 B). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die TCDD-vermittelte HIF-1 $\alpha$ -Destabilisierung durch die verringerte Hsp90-Expression sowie die unverändert Rack1-Expression nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie bewirkt wurde. Daraus folgt, dass über das Protein Rack1 ein Sauerstoff-PHD-VHL-unabhängiger Abbau von HIF-1 $\alpha$  und damit die HIF-1 $\alpha$ -Destabilisierung ermöglicht wird. Damit wird eine Lösung für die aktuell in der Literatur diskutierte Frage nach dem Mediator der Interferenz zwischen dem AhR- und HIF-1 $\alpha$ -Signalweg angeboten.

## 4 Diskussion

Brustkrebs ist das häufigste Karzinom bei Frauen (Dumitrescu *et al.* 2005). Die internationale Behörde für Krebsforschung (*international agency for research on cancer*, IARC) ermittelte im Jahr 2004 eine Inzidenz von 13 % in Europa (Boyle *et al.* 2005). Die reale Gewebsbelastung ist meist durch das Einwirken verschiedener an der Krebsauslösung beteiligter Stressoren gekennzeichnet. Diese Situation zu simulieren, war das Hauptanliegen der vorliegenden Dissertation. Dabei sollten die molekularen Reaktionsmechanismen, die bei gleichzeitiger Wirkung von Hypoxie und TCDD im Hormon-abhängigen Brustkrebs verändert sind, genauer charakterisiert werden. Die Aktivierung des AhR- und des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges wurde nach einer gleichzeitigen Exposition mit Hypoxie und der Umweltchemikalie TCDD analysiert. Die Auswirkungen auf den p53-, ER $\alpha$ - und NFAT-Signalweg wurden untersucht. Als Zellmodell kam in dieser Arbeit die humane Brustkrebszelllinie MCF-7 zum Einsatz. Diese Zelllinie wurde in verschiedenen Studien verwendet, um Östrogen-abhängige Prozesse sowie die Auswirkungen von Anti-Östrogenen – zu denen auch TCDD zu zählen ist - im Brustkrebs zu untersuchen (Katzenellenbogen *et al.* 1987; Pink *et al.* 1996). Dieses Zellmodell bietet die Möglichkeit, die Auswirkungen einer physiologisch relevanten Exposition mit TCDD und Hypoxie in einer Hormon-abhängigen Zelllinie untersuchen zu können.

### 4.1 Aktivierung des AhR- und des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges durch TCDD und/oder Hypoxie

Die in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Seifert *et al.* 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass durch 10 nM TCDD der AhR-Signalweg in MCF-7-Zellen aktiviert wurde (vgl. Abschnitt 3.1., Seite 44-46). Zu den Zielgenen des AhR zählen z.B. die Monooxygenasen (Mimura *et al.* 2003). Die Transkriptmenge der Monooxygenase Cyp1A1 wird dabei als Indikator der AhR-Aktivierung genutzt (Abdelrahim *et al.* 2003; Adachi *et al.* 2001; Zeiger *et al.* 2001). Die konzentrationsabhängige Induktion der Cyp1A1-mRNA (vgl. Abb. 3-1, Seite 44) durch TCDD wurde in MCF-7-Zellen nachgewiesen. Die toxische Wirkung von TCDD ist Gewebe-spezifisch und abhängig von den genetischen Anlagen (Poland *et al.* 1982). So sind z. B. von den Mäusestämmen DBA/2J (TCDD-resistent) und C57BL/6 (TCDD-sensitiv) Differenzen in der TCDD-Toleranz bekannt (Ema *et al.* 1994). Auch Zelllinien-spezifische Unterschiede in der Induktion von Cyp1A1 wurden gefunden, wie z. B. zwischen den humanen Hepatom-Zelllinien Hep3B (~ 100-fach) (Lee *et al.* 2006) und Sk-Hep-1 (keine Induktion) (Shiizaki *et al.* 2005). In dieser Arbeit wurde eine signifikante Induktion der Cyp1A1-mRNA-Menge nach 3 bis 6 Stunden

Inkubation mit 10 nM TCDD in MCF-7-Zellen gemessen (Abb. 3-3, Seite 46). Durch Translokationsstudien mit einem AhR-GFP-Konstrukt wurde die Lokalisierung des AhR im Kern nach 2 ½ Stunden nachgewiesen (Abb. 3-2, Seite 45). Diese Ergebnisse korrelieren gut mit der in der Literatur beschriebenen Translokation des AhR in murinen Hepatozyten, die nach 2 Stunden erfolgte (Chang *et al.* 1998; Song *et al.* 2003). Die Bindung von TCDD verkürzt die Halbwertszeit des AhR durch Induktion des AhR-Abbaus über das 26S Proteasom von 28 h auf 3 h (Ma *et al.* 2002). Die nachgewiesene AhR-Translokation in den Kern sowie die anschließende Induktion des AhR-Zielgenes Cyp1A1 in MCF-7-Zellen zeigen, dass die TCDD-Bindung zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AhR führt. Dies wurde zusätzlich durch den Einsatz des AhR-spezifischen Antagonisten  $\alpha$ -Naphthoflavon (ANF) verdeutlicht, der sowohl die Translokation des AhR als auch die Induktion der Cyp1A1-mRNA-Menge konzentrationsabhängig inhibierte. 10  $\mu$ M ANF inhibieren die TCDD-vermittelte Induktion der Cyp1A1-mRNA-Menge vollständig (Abb. 3-2, Seite 45). Bekannt ist, dass ANF an den AhR bindet und mit diesem einen Komplex bildet (Gasiewicz *et al.* 1996). ANF verändert dabei die Proteinkonformation des AhR. Ein Überschuß von ANF vor der TCDD-Zugabe blockiert den AhR im Zytosol konzentrationsabhängig (Gasiewicz *et al.* 1996; Henry *et al.* 1999).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Hypoxie (5 % O<sub>2</sub>) in MCF-7-Zellen den HIF-1 $\alpha$ -Signalweg induziert (vgl. Abschnitt 3.2., Seite 46-47). In Mammakarzinomen des Stadiums T1B bis T4 ist der mittlere Sauerstoffpartialdruck, wie bereits erwähnt, auf 3,68 % O<sub>2</sub> im Vergleich zum normalen Brustgewebe (8,55 % O<sub>2</sub>) verringert (Vaupel *et al.* 2002). Korrelierend mit diesen Daten wurde in der vorliegenden Arbeit eine starke Akkumulierung von HIF-1 $\alpha$  bei einer Sauerstoffkonzentration von 5 % innerhalb von 4 h bis 8 h detektiert (Abb. 3-4, Seite 47). Da eine transkriptionelle Regulation von HIF-1 $\alpha$  nach Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie ausgeschlossen werden konnte (Anhang Abschnitt 7.1.2. A), ist die Erklärung hierfür in einer posttranskriptionellen HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung zu suchen. Die in dieser Arbeit verwendete Sauerstoffkonzentration von 5 % liegt im physiologischen Bereich. Die Sauerstoffkonzentrationen, die zur Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  führen, wurden unterschiedlich beschrieben. Zur Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit sollen einige Literaturdaten aufgeführt werden. In der humanen Hepatom-Zelllinie Hep3B wurde eine Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  nach 4 h bei 1,5 % O<sub>2</sub> (Chandel *et al.* 2000), in humanen Glioblastomzellen nach Stimulation für 3 h bis 9 h mit 2 % O<sub>2</sub> (Obach *et al.* 2004) und in einem squamösen Karzinom nach Exposition für 8 h mit 6 % O<sub>2</sub> (Quintero *et al.* 2006) gefunden.

Ein Zielgen von HIF-1 $\alpha$  ist VEGF (Ruohola *et al.* 1999). Es wurde in der vorliegenden Arbeit zur Analyse der transkriptionellen Aktivität von HIF-1 $\alpha$  verwendet. Die Veränderung der VEGF-Transkriptmenge wurde ebenfalls in anderen Studien als Indikator der HIF-1 $\alpha$ -Aktivierung verwendet (Bando *et al.* 2003; Laughner *et al.* 2001; Mizukami *et al.* 2006). In dieser Arbeit wurde in MCF-7-Zellen eine 4,5-fache Erhöhung der VEGF-mRNA-Menge unter hypoxischen Bedingungen beobachtet (Abb. 3-4, Seite 47).

Nach den Untersuchungen zur Aktivierung des AhR durch TCDD und des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges durch Hypoxie erfolgte die Analyse der Interferenz zwischen dem AhR- und HIF-1 $\alpha$ -Signalweg nach gleichzeitiger Stimulation. Dazu wurde die humane Hepatom-Zelllinie HepG2 mitgeführt. Diese Zelllinie ist ein häufig verwendetes Zellmodell, um Hypoxie und den Einfluss von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren auf den HIF-1 $\alpha$  Signalweg zu untersuchen (Stiehl *et al.* 2002; Tacchini *et al.* 2001).

Hypoxie hatte nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD keinen zusätzlichen Einfluss auf den AhR-Signalweg in MCF-7-Zellen, während in HepG2-Zellen ein inhibierender Effekt festgestellt wurde (vgl. Abschnitt 3.3., Seite 47-49). Der Einfluss von Hypoxie auf den AhR-Signalweg war dabei von der TCDD-Sensitivität der Zelllinien abhängig. Unter hypoxischen Bedingungen war die TCDD-Wirkung in HepG2-Zellen reduziert, was durch die Induktion der XRE-vermittelten Promotoraktivität sowie der Cyp1A1-mRNA- und Proteinexpression gezeigt wurde (Anhang Abschnitt 7.1.1. A bis C). Kein Unterschied konnte in MCF-7-Zellen zwischen den TCDD-Effekten unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen gefunden werden (Abb. 3-6, Seite 49). Die Reduktion der XRE-vermittelten Promotoraktivität und der AhR-vermittelten Transkription durch Hypoxie oder durch Hypoxie-induzierende Substanzen wurde bereits in verschiedenen Hepatom-Zelllinien (Kim *et al.* 2000a; Kim *et al.* 2000b; Park *et al.* 1999; Pollenz *et al.* 1999) und in Mäusen (Davidson *et al.* 2003) und Ratten (Ishimura *et al.* 2002) gezeigt. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass unter normoxischen Bedingungen MCF-7-Zellen weniger sensitiv auf eine TCDD-Stimulation reagierten als HepG2-Zellen. Dies wurde durch die geringere Induktion des AhR-Signalweges deutlich. Die hohe TCDD-Sensitivität der XRE-vermittelten Promotoraktivität in HepG2-Zellen ist vergleichbar mit der Aktivität in der humanen Mammakarzinomzelllinie T47D (Thomsen *et al.* 2004). Die in murinen B-Zell-Lymphomen (Sulentic *et al.* 2004) und in Nierenfibroblasten (Karchner *et al.* 2002) detektierte XRE-vermittelte Promotoraktivität ist mit der in MCF-7-Zellen ermittelten TCDD-Sensitivität vergleichbar. Die Zelltyp-spezifische Induktion des AhR-Zielgenes Cyp1A1 wurde bereits im ersten Abschnitt dieses Kapitels erwähnt. Die

unterschiedliche TCDD-Sensitivität beider Zelllinien und die Möglichkeit der Reduktion der XRE-vermittelten Promotoraktivität bzw. Zielgenexpression unter hypoxischen Bedingungen in HepG2-Zellen könnten auf eine veränderte AhRR-Expression zurückzuführen sein. Es wird angenommen, dass der AhRR durch Kompetition den AhR-Signalweg blockiert und die AhR-vermittelte Induktion der Zielgene vermindert (Baba *et al.* 2001; Karchner *et al.* 2002; Mimura *et al.* 1999). Der AhRR wird konstitutiv exprimiert, wobei die AhRR-mRNA-Menge in MCF-7-Zellen 2-fach höher exprimiert wird als in HepG2-Zellen (Bernshausen *et al.* 2005; Tsuchiya *et al.* 2003). Diese Tatsache könnte die unterschiedliche TCDD-Sensitivität beider Zelllinien erklären. Weiterhin sollte die Expression des AhRR unter hypoxischen Bedingungen in HepG2-Zellen untersucht werden. Falls diese zusätzlich induziert wäre, könnte die Reduktion der XRE-vermittelten Promotoraktivität bzw. Zielgenexpression unter hypoxischen Bedingungen in HepG2-Zellen erklärt werden.

Die gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie reduziert im Vergleich zur Einzelstimulation mit Hypoxie die Aktivierung des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges in MCF-7- und HepG2-Zellen signifikant (vgl. Abschnitt 3.4., Seite 50-52). In beiden Zelllinien wurde eine verringerte HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung und HRE-vermittelte Promotoraktivität im Vergleich zur Stimulation mit Hypoxie nachgewiesen (Abb. 3-7, 3-8, Seite 50-51, Anhang Abschnitt 7.1.2. B, C). Hofer *et al.* (Hofer *et al.* 2004), Gradin *et al.* (Gradin *et al.* 1996) und Prash *et al.* (Prash *et al.* 2004) konnten keine signifikanten Änderungen in der Hypoxie-vermittelten Transkriptionsrate in Ratten, in einer Hepatom-Zelllinie und im Zebrafisch aufzeigen. Im Gegensatz dazu und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit beschrieben Chan und Koautoren (Chan *et al.* 1999) sowie Nie und Koautoren (Nie *et al.* 2001) eine Verringerung der HRE-vermittelten Promotoraktivität in der Hepatom-Zelllinie Hep3B nach Stimulation mit Hypoxie-induzierenden Substanzen sowie TCDD. Die möglichen Mediatoren der TCDD-vermittelten Reduktion des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges werden in Abschnitt 4.4 und 4.5 diskutiert. Weiterhin wurde in HepG2-Zellen in dieser Arbeit eine zusätzliche Induktion der HRE-vermittelten Promotoraktivität nach gleichzeitiger Stimulation mit Hypoxie und dem AhR-Inhibitor ANF im Vergleich zur Stimulation nur mit Hypoxie detektiert. Dies spricht dafür, dass der AhR-Signalweg in HepG2 konstitutiv aktiv ist und den HIF-1 $\alpha$ -Signalweg reprimiert.

Die Transkription des HIF-1 $\alpha$ -Zielgenes VEGF war nach Hypoxie sowie nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie erhöht (4- bis 5-fach, Abb. 3-8, Seite 51). Dies steht im Gegensatz zur beobachteten verringerten HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung und transkriptionellen Aktivität. Wie bereits erwähnt, ist die Zelllinie MCF-7 ER-positiv. In der ER-negativen Zelllinie MDA-MB-

231 wurde nach Stimulation mit 1 % bis 3 % O<sub>2</sub> eine 1,7- bis 1,8-fache Induktion der VEGF-Transkriptmenge ermittelt (Bachelder *et al.* 2001; Bando *et al.* 2003). Der Vergleich dieser Daten und der Daten von Ruohola und Koautoren (Ruohola *et al.* 1999) legt die Schlussfolgerung nahe, dass die VEGF-Expression zusätzlich durch Östrogen induziert werden kann. Deshalb ist anzunehmen, dass bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien die Verringerung der VEGF-Transkription durch die in Kapitel 3.5 beschriebene Induktion des ER $\alpha$ -Signalweges nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie verhindert wird.

Die Untersuchungen der Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -Signalweg zeigen deutlich, dass MCF-7-Zellen den Vorteil haben, dass eine Inhibierung des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges bei konstanter Induktion des AhR-Signalweges nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie untersucht werden kann. Die bisher verwendeten Zellmodellen, einschließlich der Zelllinie HepG2, ermöglichen nur die Analyse der Interferenz bei gleichzeitiger Inhibierung des AhR- und HIF-1 $\alpha$ -Signalweges (Chan *et al.* 1999; Nie *et al.* 2001) oder ausschließlicher Inhibierung des AhR-Signalweges bei konstanter Aktivierung des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges (Gassmann *et al.* 1997; Gradin *et al.* 1996; Hofer *et al.* 2004; Kim *et al.* 2000a; Park *et al.* 1999; Pollenz *et al.* 1999). Außerdem können in MCF-7-Zellen die Auswirkungen einer physiologisch relevanten Exposition mit TCDD und Hypoxie auf Hormon-abhängige Prozesse untersucht werden.

#### **4.2 Einfluss von TCDD und Hypoxie auf den p53- und den ER $\alpha$ -Signalweg**

Östrogen spielt eine entscheidende Rolle bei der Initiation und der Weiterentwicklung von Mammakarzinomen (Henderson *et al.* 1988). MCF-7-Zellen sind das am besten charakterisierte Zellmodell für den Östrogen-abhängigen Brustkrebs (Pink *et al.* 1996). Die inhibitorische Wechselwirkung zwischen dem AhR- und dem ER $\alpha$ -Signalweg sowie zwischen dem HIF-1 $\alpha$ - und dem p53-Signalweg wurden in den Abschnitten 1.4.4 bzw. 1.3.5 näher beschrieben. Die Konsequenzen der Aktivierung des AhR- und des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges auf andere Signalwege sind bis heute unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die gleichzeitige Aktivierung des AhR- und des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges eine Inhibierung des p53- und eine Aktivierung des ER $\alpha$ -Signalweges verursacht.

Die gleichzeitige Aktivierung des AhR- und des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges in MCF-7-Zellen inhibiert sowohl die Expression des p53-Proteins als auch die p53-vermittelte Transkription (Abb. 3-9, Seite 53, Anhang 7.1.3. A, siehe Schema Abb. 4-1). Einzelstimulationen mit TCDD oder Hypoxie rufen dagegen keine Veränderung der p53-Expression und Aktivität

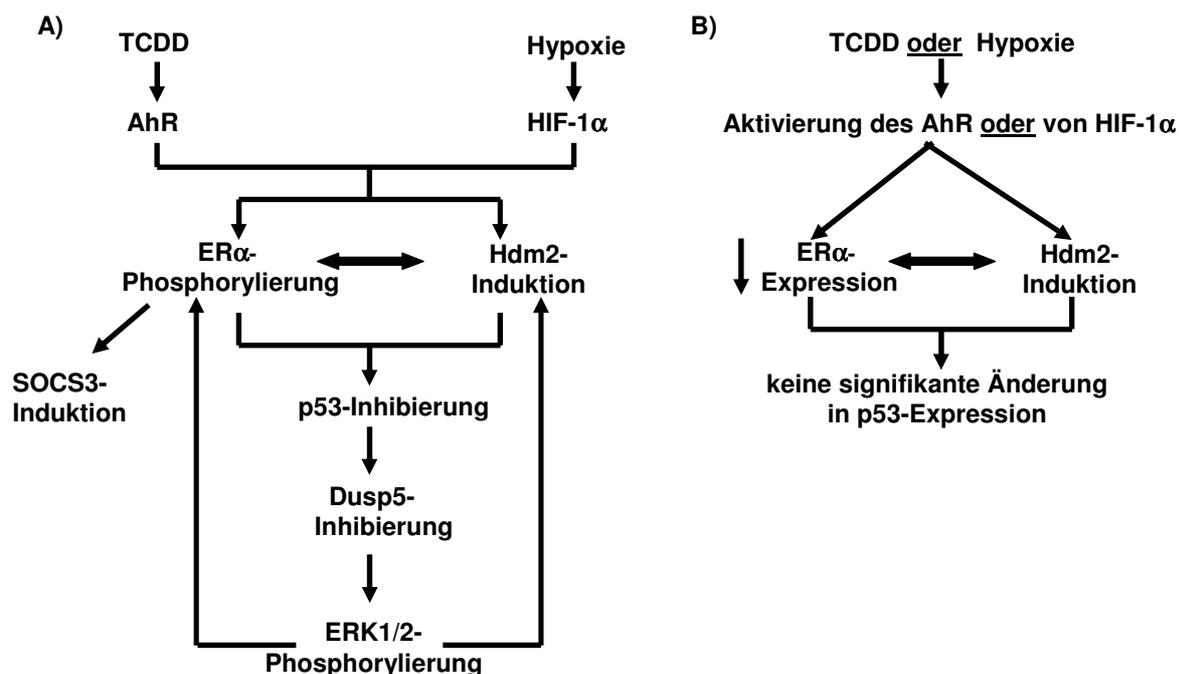
hervor. Mehrere Mechanismen sind bekannt, die die p53-Proteinexpression beeinflussen können. Der Abbau von p53 wird durch die E3-Ubiquitinligase Hdm2 vermittelt (Ryan *et al.* 2001), deren Expression durch den ER $\alpha$  induziert werden kann (Bond *et al.* 2006; Bond *et al.* 2004). Das in Folge von TCDD-Stimulation gebildete AhR/ARNT Heterodimer kann ebenfalls direkt mit dem ER $\alpha$  assoziieren (Ohtake *et al.* 2003) und induziert daher östrogene Effekte. Weiterhin kann auch HIF-1 $\alpha$  direkt mit dem ER $\alpha$  interagieren und den ER $\alpha$ -Abbau induzieren (Cho *et al.* 2005). Cho und Koautoren (Cho *et al.* 2006) konnten 2006 zusätzlich zeigen, dass erhöhte HIF-1 $\alpha$ -Proteinmengen trotz des gesteigertem Abbaus von ER $\alpha$  den ER $\alpha$ -Signalweg Liganden-unabhängig aktivieren. Aus diesem Grund besteht die Möglichkeit, dass sowohl der AhR- als auch der HIF-1 $\alpha$ -Signalweg die ER $\alpha$ -Signalkaskade induzieren und folglich die Hdm2-Expression erhöhen. Wie in Abschnitt 3.5 (Abb. 3-12, Seite 56) gezeigt wurde, wird die Aktivität des ER-Response-Elements allerdings ausschließlich nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie induziert. Eine Begründung dafür ist die in der vorliegenden Arbeit und in der Literatur beschriebene Inhibierung der ER $\alpha$ -Proteinexpression durch TCDD (Krishnan *et al.* 1995; Wang *et al.* 1993) sowie durch niedrige Sauerstoffkonzentrationen (Cho *et al.* 2005). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Aktivierung des ER $\alpha$ -Signalweges durch Aktivierung des AhR- oder des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges könnte durch die Reduktion der ER $\alpha$ -Proteinexpression inhibiert werden (Abb. 3-14, Seite 58). Nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie ist jedoch die ER $\alpha$ -Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Zudem wurde eine Induktion des ER $\alpha$ -Signalweges sowie die Hdm2-vermittelte Inhibierung der p53-Expression beobachtet. Sowohl Hypoxie als auch TCDD erhöhen die Hdm2-Transkriptmenge signifikant. Nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie wird die Hdm2-Transkription zusätzlich gesteigert (Abb. 3-9, Seite 53, Schema Abb. 4-1). Weiterhin konnte eine stärkere Aktivierung der ER $\alpha$ -Signalkaskade nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie im Vergleich zur Einzelstimulation (Abb. 3-11, Seite 55) gezeigt werden. Daraus resultiert die zusätzliche Erhöhung der Hdm2-Transkriptmenge. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde von Paajarvi und Koautoren (Paajarvi *et al.* 2005) beschrieben, dass Einzelstimulation mit TCDD die mdm2 Proteinexpression erhöht, wodurch das Protein p53 abgebaut wird. Hdm2 interagiert mit dem N-Terminus von p53, inhibiert dessen transkriptionelle Aktivität und fördert den Abbau von p53 (Ryan *et al.* 2001). Weiterhin wurde eine indirekte Interaktion zwischen HIF-1 $\alpha$  und p53 über Hdm2 beschrieben (Chen *et al.* 2003). Dies lässt vermuten, dass an der nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie beobachteten Verringerung der p53-Proteinmenge der Hdm2-vermittelte Abbau beteiligt ist.

Aber auch eine weitere Interaktionsebene, die zwischen Hdm2 und dem ER $\alpha$ , verdient Beachtung (Schema Abb. 4-1). Im Brustkrebsgewebe korreliert eine erhöhte ER $\alpha$ -Expression mit einer erhöhten Hdm2-Expression (Liu *et al.* 2000). Eine Überexpression von Hdm2 steigert die Funktion des ER $\alpha$  (Saji *et al.* 2001). Zusätzlich wurde von Sayeed und Koautoren (Sayeed *et al.* 2007) gezeigt, dass ER $\alpha$  direkt an p53 binden und dessen Aktivität inhibieren kann. Deshalb ist bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen davon auszugehen, dass sowohl die Aktivierung des ER $\alpha$  als auch die transkriptionelle Regulation von Hdm2 die Inhibierung der p53-Expression vermitteln (Schema Abb. 4-1).

Die reduzierte p53-Proteinexpression resultiert in der verringerten Transkription und Proteinexpression des p53-Zielgenes Dusp5 (Anhang Abschnitt 7.1.3 B, Abb. 3-10, Seite 54). Die transkriptionelle Regulation von Dusp5 über das p53-Response-Element im Promotor wurde bereits beschrieben (Ueda *et al.* 2003). Eine funktionelle Studie zeigte, dass Dusp5 speziell die Proteine ERK1/2 dephosphorylieren kann (Ueda *et al.* 2003). Mandl und Koautoren (Mandl *et al.* 2005) beschrieben, dass Dusp5 spezifisch und direkt ERK2 über das Kinase-interagierende Motiv bindet. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Verringerung der Dusp5-Expression nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie in einer erhöhten ERK2-Phosphorylierung und einer erhöhten transkriptionellen Aktivität von ER $\alpha$  resultiert (Abb. 3-11, 3-12, Seite 55-56). Außerdem wurde die Transkription der Phosphatasen MKP1 und PAC1 untersucht. Die Transkriptmenge von MKP1 und PAC1 wurde nach Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie nicht verändert (vgl. Abschnitt 7.1.3. C). Der Einfluss anderer Transkriptionsfaktoren auf die Regulation beider Phosphatasen ist hier wahrscheinlich. Die Phosphatase PAC1 wird z.B. durch den Transkriptionsfaktor E2F-1 und MKP1 durch den Transkriptionsfaktor JNK1 induziert (Sanchez-Tillo *et al.* 2007; Wu *et al.* 2007). Weiterhin wurde die Induktion des ER $\alpha$ -Zielgenes SOCS3 (*suppressor of cytokine signalling*) nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie beobachtet (Abb. 3-12, Seite 56). So spielt SOCS3 z. B. eine wichtige Rolle im IL6-Signalweg, wo es die IL6-induzierte Transkription inhibiert (Crocker *et al.* 2003). Matthews *et al.* (Matthews *et al.* 2005) beschrieben, dass Östrogen über das im SOCS3-Promotor enthaltene ERE die Expression von SOCS3 erhöht. Die Induktion von SOCS3 durch TCDD und Hypoxie könnte ein neuer Mechanismus zur Regulation von verschiedenen Zytokinen darstellen. So wurde bereits beschrieben, dass TCDD die Interleukin-6-Expression verringern kann (Jensen *et al.* 2003). Die SOCS3-vermittelte Suppression verschiedener Zytokin-Signalwege könnte in die TCDD-vermittelte Toxizität oder in metabolische Störungen münden.

Ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie eine verringerte Dusp5-Expression und erhöhte Phosphorylierung der

MAPK ERK1/2 zu der detektierten Inhibierung des p53-Signalweges führt (Schema Abb. 4-1). Die Aktivierung des ER $\alpha$  über die Phosphorylierung von unterschiedlichen Aminosäuren (S104, S106, S118, S167, S236, Y537) wird durch verschiedenen Kinasen vermittelt (Pearce *et al.* 2004). Darunter befinden sich auch MAPK (inklusive ERK1/2), die den humanen ER $\alpha$  am S118 phosphorylieren und damit aktivieren kann (Joel *et al.* 1998; Likhite *et al.* 2006). Außerdem ist die Dephosphorylierung von ER $\alpha$  am S118 durch die Phosphatase Dusp22 - allerdings bis heute nicht durch Dusp5 - beschrieben (Sekine *et al.* 2007). Um die Aktivierung des ER $\alpha$ -Signalweges über die erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 durch die Inhibierung der Dusp5-Expression zu zeigen, wurde die Dusp5-Expression durch eine spezifische siRNA reprimiert (Abb. 3-13, Seite 57). Damit Sequenz-spezifische Effekte einer siRNA auf die Zielgenexpression detektiert werden können, wurden entsprechende Kontrollen mitgeführt. Als Kontrolle kann z.B. eine siRNA verwendet werden, die sich nur in wenigen Basen von der spezifischen siRNA unterscheidet. Jedoch haben Untersuchungen gezeigt, dass ein sogenannter *missmatch* von nur wenigen Basen die mRNA Expression dennoch beeinflussen kann (Jackson *et al.* 2003). Eine zweite Möglichkeit ist der Einsatz von siRNA, die keine Homologie zum menschlichen Genom besitzt (Elbashir *et al.* 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die letztgenannte siRNA als Kontrolle sowie zur Detektion Sequenz-unspezifischer Effekte verwendet. In MCF-7-Zellen hatte die Inhibierung der Dusp5-Expression mittels siRNA eine erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 zur Folge (Abb. 3-14 A, Seite 58). Zusätzlich wurde eine erhöhte transkriptionelle Aktivität von ER $\alpha$  sowie eine Induktion des ER $\alpha$ -Zielgenes SOCS3 beobachtet (Abb. 3-14 B, C, Seite 58). Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass die Inhibierung des p53-Zielgenes Dusp5 über die erhöhte ERK1/2 Phosphorylierung die Aktivierung von ER $\alpha$ , vermutlich über dessen Phosphorylierung, vermittelt. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass auch Dusp5, wie Dusp22, ER $\alpha$  dephosphoryliert und somit eine Dusp5-Reduktion die ER $\alpha$ -Dephosphorylierung verhindert. Diese Effekte könnten zur beobachteten Induktion der ER $\alpha$ -vermittelten transkriptionellen Aktivität geführt haben.



**Abb. 4-1:** A) Netzwerk der TCDD-vermittelten Inhibition des p53-Signalweges sowie die Induktion des ER $\alpha$ -Signalweges in MCF-7-Zellen unter hypoxischen Bedingungen. Durch diese Mechanismen könnten die TCDD-vermittelte Progression des Brustkrebses vermittelt werden. Die beschriebenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass TCDD und Hypoxie im Signalnetzwerk oberhalb des MAPK/ERK-Signalweges agieren. Zusätzlich zu den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen konnten Phelps und Koautoren (Phelps *et al.* 2005) durch die Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife auf die Hdm2-Proteinsynthese zeigen. B) Einzelstimulation mit TCDD oder Hypoxie verursacht keine Inhibition des p53-Signalweges

Um diese These zu stützen, wurde der ERK1/2-induzierte Effekt auf die ER $\alpha$ -vermittelte transkriptionelle Induktion durch den für die MAPKK (MEK1/2) spezifischen Inhibitor (PD98059) (Watts *et al.* 1996) untersucht. Dieser Inhibitor verhindert die Phosphorylierung von ERK1/2. PD98059 verhinderte die Induktion der ERE-vermittelten Promotoraktivität nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie (Abb. 3-11, Seite 55). Dies bestätigt die Beobachtung, dass eine verringerte ERK1/2-Phosphorylierung in einer reduzierten ER $\alpha$ -Aktivität resultiert. Nach Einzelstimulation mit TCDD oder Hypoxie wurde keine Veränderung in der ERE-vermittelten Promotoraktivität gefunden. Dieses Ergebnis kann mit der Tatsache begründet werden, dass die Phosphorylierung von verschiedenen Aminosäuren (S104, S106, S118, S167, S236, Y537) durch unterschiedliche Kinasen die transkriptionelle Aktivität von ER $\alpha$  kontrolliert. Deshalb führt die Inhibition der Phosphorylierung von ERK1/2 durch PD98059 nicht zwangsweise zur Reduktion der ER $\alpha$ -Aktivität. Nach der Inhibition durch PD98059 wurde die Hdm2-Transkription nur minimal beeinflusst, so dass die nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie induzierte Hdm2-Transkription nicht auf der

verstärkten ERK1/2-Phosphorylierung und ER $\alpha$ -Aktivierung beruht. Vielmehr scheint die erhöhte Hdm2-Transkription eine direkte Folge der Aktivierung des AhR sowie des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges zu sein (Schema Abb. 4-1).

Der humane Tumorsuppressor p53 reguliert als Transkriptionsfaktor zahlreiche Veränderungen, die vom Arrest des Zellzyklus, der Apoptose, der DNA-Reparatur bis zur Kontrolle der mitochondrialen Atmung reichen (Horn *et al.* 2007). Der Verlust von p53 spielt daher eine kritische Rolle bei der Entstehung und Progression von Krebs. Außerdem erwies sich die östrogene Sensitivität von MCF-7-Zellen als relevant für die Tumorigenese, die Invasion und die Metastasierung (DePasquale *et al.* 1999). Deshalb stellt die Kombination einer Inhibierung des p53-Signalweges und einer Induktion des ER $\alpha$ -Signalweges (siehe Abb. 4-1) einen neuen Mechanismus dar, der die TCDD-vermittelte Tumorpromotion in MCF-7-Zellen unter hypoxischen, d.h. Tumor-physiologischen Bedingungen begünstigt und über die ER $\alpha$ -Induktion und p53-Inhibierung die Weiterentwicklung des Brustkrebses fördert.

### **4.3 Aktivierung des NFAT-Signalweges durch TCDD und Hypoxie**

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Identifizierung des Transkriptionsfaktors NFATc2 als AhR- und HIF-1 $\alpha$ -reguliertes Gen in einer Mikroarray-Analyse (Anhang Abschnitt 7.2). In der Literatur wurden bereits Mikroarray-Analysen von Zellen bzw. Geweben von Versuchstieren nach Einzelstimulation mit TCDD oder Hypoxie beschrieben (Bando *et al.* 2003; Fletcher *et al.* 2005; Hanlon *et al.* 2005; Martinez *et al.* 2002; McHale *et al.* 2007). Im letzten Jahr wurde erstmals eine Mikroarray-Analyse von Hepatom-Zellen nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und der Hypoxie-induzierenden Chemikalie Kobaltchlorid veröffentlicht (Lee *et al.* 2006). Mit der in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Mikroarray-Analyse konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Stimulation von MCF-7-Zellen mit TCDD und Hypoxie unter Östrogen-reduzierten Bedingungen die Transkription der BNIP3- und NFATc2-mRNA reduziert sowie die Plaur-, Akt3- und ATX-mRNA erhöht (Anhang Abschnitt 7.2). Die Regulation des Transkriptionsfaktors NFATc2 nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie ist besonders interessant und wird im nächsten Abschnitt auch im Zusammenhang mit der Expression von Autotaxin diskutiert. Ergänzend sei angemerkt, dass eine Reduktion der BNIP3-Expression unter hypoxischen Bedingungen ebenfalls in Lungenkrebszellen (Giatromanolaki *et al.* 2004) detektiert werden konnte. Die Reduktion der BNIP3-Expression ist assoziiert mit dem Wachstum von Brustkrebsmetastasen in anderen Geweben (Manka *et al.* 2005). Die Induktion des Rezeptors Plaur unter hypoxischen Bedingungen in Krebszellen sowie die Erhöhung der Akt3-Expression nach Hypertrophie im Herzen wurde ebenfalls bereits beschrieben (Taniyama *et al.* 2005; Trisciuglio *et al.* 2004).

Weitere Übereinstimmungen der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen differentiellen Genexpression mit anderen publizierten Mikroarray-Daten konnten nicht detektiert werden. Wodurch verdeutlicht wird, dass die Schemata der Genexpression stark durch den individuell verwendeten Expositionsmodus beeinflusst werden.

Aufgrund der im Mikroarray beobachteten Regulation der NFATc2-mRNA wurde der Einfluss von TCDD und Hypoxie auf den NFAT-Signalweg genauer untersucht. Unter Östrogenhaltigen Bedingungen wurde der NFATc2 sowohl durch TCDD als auch durch Hypoxie transkriptionell reguliert. Über die Regulation des NFAT ist bis heute nur wenig bekannt. Nur Rao *et al.* (Rao *et al.* 1997) konnten einen positiven Rückkopplungsmechanismus auf die NFAT-Transkription nach NFAT-Aktivierung zeigen. Es kann daher vermutet werden, dass die beobachtete Reduktion der NFATc2-Transkriptmenge nach Stimulation mit TCDD oder Hypoxie durch eine Inaktivierung von NFATc2 initiiert wird, was aber im Detail noch aufzuklären ist. NFATc2 ist mit NFATc1 strukturell und funktionell hoch homolog (Northrop *et al.* 1994). Aufgrund des für die vorliegende Arbeit zur Verfügung stehenden NFATc1-EGFP-Expressionsvektors bzw. NFATc1-Antikörpers zur Analyse der NFAT-Aktivierung wurde nur die Translokation von NFATc1 in den Kern untersucht.

Es konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass der AhR- und der HIF-1 $\alpha$ -Signalweg die Kernlokalisierung und folglich die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFATc1 in MCF-7-Zellen induzieren (Abb. 3-16, 3-17, 3-18 A, Seite 60-62). Wilkins und Koautoren (Wilkins *et al.* 2004) nehmen eine Verbindung zwischen der hypertrophen Antwort (Organvergrößerung) und dem Calcineurin-NFAT-Signalweg an. Eine Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  wurde nach Induktion einer Hypertrophie in Kardiomyozyten beschrieben (Shyu *et al.* 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Analyse der NFATc1-Translokation die Aktivierung des NFAT-Signalweges durch TCDD oder Hypoxie nachgewiesen werden. Außerdem konnte mit Hilfe des Inhibitors CsA gezeigt werden, dass die Aktivierung des NFAT-Signalweges durch TCDD oder Hypoxie Calcineurin-abhängig ist. Calcineurin ist eine Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Serin-Threonin-Proteinphosphatase und beeinflusst zahlreiche zelluläre Prozesse (Blumenthal *et al.* 1986; Crabtree *et al.* 2002; Dawson *et al.* 1993; Lynch *et al.* 2005; Rusnak *et al.* 2000; Sugimoto *et al.* 1997). Die Inhibierung der Aktivität der Phosphatase Calcineurin durch CsA (Huai *et al.* 2002; Jin *et al.* 2002) verhindert die Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors NFAT (Jain *et al.* 1993; McCaffrey *et al.* 1993; O'Keefe *et al.* 1992). Weiterhin vermitteln Hypoxie und TCDD eine Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (Puga *et al.* 1997; Toescu *et al.* 2004). Diese Daten implizieren, dass die durch TCDD bzw. Hypoxie hervorgerufene Induktion des NFATc1-Signalweges durch die Calcium-abhängige Aktivierung von Calcineurin verursacht wird.

Im Abschnitt 3.6 (Abb. 3-18 B, Seite 62, Anhang Abschnitt 7.1.4 B) wurde gezeigt, dass der AhR- oder der HIF-1 $\alpha$ -Signalweg die Expression und die Aktivität des NFAT-Zielgenes Autotaxin (ATX) induzieren. Frühere Studien haben beschrieben, dass ATX im Melanom (Stracke *et al.* 1992), Neuroblastom (Kawagoe *et al.* 1997), Hepatom-Zellen (Zhao *et al.* 1999), Lungenkarzinom (Yang *et al.* 1999), Nierenzellkarzinom (Umezū-Goto *et al.* 2002) und Brustkarzinom (Yang *et al.* 2002) überexprimiert ist. Die Regulation von ATX ist noch weitgehend unbekannt. Nachfolgend sind einige bekannte Induktoren der ATX-Transkription aufgeführt. So induziert der  $\alpha 6\beta 4$ -Integrin-Signalweg ATX über den Transkriptionsfaktor NFAT1 (Chen *et al.* 2005). Weiterhin wurde die Regulation von ATX durch v-Jun (Black *et al.* 2004) und die Erhöhung der ATX-Expression durch TNF $\alpha$  in Adipozyten beschrieben (Boucher *et al.* 2005). Der Inhibitor ANF erhöht die ATX-mRNA-Menge unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Die Inhibierung des TCDD-vermittelten Effektes konnte an dieser Stelle nicht beobachtet werden. ANF inhibiert nicht nur den AhR. Es ist außerdem bekannt, dass es an Cyp1A1 bindet und dessen Aktivität verringert. Außerdem kann die Aktivität von Cyp1A3 im Gegensatz zu Cyp1A1 durch ANF erhöht wird (Harlow *et al.* 1997). Damit ist der beobachtete Eigeneffekt von ANF auf die ATX-mRNA-Expression durch die ANF-vermittelte Beeinflussung anderer Proteine zu erklären.

Es konnte gezeigt werden, dass der aktivierte AhR-Signalweg die ATX-Expression und Aktivität über NFATc1 induziert und die Migration von MCF-7-Zellen unter normoxischen Bedingungen erhöht (Abb. 3-19 A, Seite 63). ATX wurde als Mitglied der Ectonukleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase-Familie (E-NPP) klassifiziert (Clair *et al.* 1997; Murata *et al.* 1994). Durch die Lysophospholipase D-Aktivität des ATX wird das Substrat Lysophosphatidylcholin (LPC) zu Lysophosphatidylsäure (LPA) hydrolysiert. Außerdem sind verschiedene andere Glycerophospholipide als Substrate für das Enzym ATX bekannt (Aoki *et al.* 2002; Tokumura *et al.* 2002; Umezū-Goto *et al.* 2002). ATX stimuliert über dessen Aktivität die ungerichtete und gerichtete Migration von Brustkarzinomzellen (Chen *et al.* 2005; Jauliac *et al.* 2002; Yiu *et al.* 2006), Nieren- und Schilddrüsentumorzellen sowie Melanom- und Neuroblastom-Zellen (Kawagoe *et al.* 1997; Kehlen *et al.* 2004; Stracke *et al.* 1992; Yang *et al.* 2002; Yang *et al.* 1999). LPA, das Produkt der ATX vermittelten Hydrolyse, bindet an EDG- (endothelial differentiation gene) Rezeptoren (Lynch *et al.* 2002; Schulte *et al.* 2001) und aktiviert GTPasen der Rho-Familie (rac1, cdc42 and rho). Dadurch wird die fokale Adhensionskinase (FAK) phosphoryliert und das Zytoskelett reorganisiert (Jung *et al.* 2002; Swarthout *et al.* 2000). Außerdem wurde eine Verringerung der Migration der DMSO-behandelten MCF-7-Zellen nach NFAT-Inhibierung mittels CsA unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen beobachtet. Eine Erklärung dafür wäre die Komplex-

bildung von CsA mit intrazellulären Immunophilinen, welche wiederum die Aktivität anderer Signaltransduktionsmoleküle in der Zelle beeinflussen (Fruman *et al.* 1994; Walsh *et al.* 1992).

Es wurde nachgewiesen, dass Hypoxie die Migration von MCF-7-Zellen nicht erhöht (Abb. 3-19 A, Seite 63), allerdings werden der NFAT-Signalweg und die ATX-Expression/Aktivität induziert. Weiterhin reagieren die migrierenden MCF-7-Zellen unter hypoxischen Bedingungen nicht sensitiv auf LPA (Abb. 3-19 B, Seite 63). Corley und Koautoren (Corley *et al.* 2005) beschrieben eine verringerte Phosphorylierung der FAK, welche zu einer reduzierten Migration von Gefäßmuskelzellen unter hypoxischen Bedingungen führt. Diese Daten implizieren, dass in MCF-7-Zellen trotz der erhöhten ATX-Expression bzw. Produktion von LPA eine Induktion der Migration unter hypoxischen Bedingungen verhindert wird. Die diesem Effekt zu Grunde liegenden Signalwege sind nicht bekannt. Vermutlich werden einige zur Regulation der Migration benötigten Proteine blockiert.

Die gleichzeitige Aktivierung des AhR- und des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges verhindert die Induktion des NFAT-Signalweges und die Migration in MCF-7-Zellen (vgl. Abschnitt 3.6, Seite 59 bis 63). Unter diesen Bedingungen ist es wahrscheinlich, dass die Dephosphorylierung von NFAT durch Calcineurin verhindert wird. Dieser Effekt könnte durch Veränderung in der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration begründet sein, welche durch die Interferenz des AhR- und des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges verursacht werden.

Es ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor NFAT nicht nur eine Rolle in Zellen des Immunsystems spielt (Graef *et al.* 2001), sondern auch bei der Progression von Karzinomen. Yiu *et al.* (Yiu *et al.* 2006) beschrieben, dass NFAT die Invasion von Brustkrebszellen fördert. Außerdem wurde die verstärkte Invasion von Brustkrebszellen durch den  $\alpha$ 6 $\beta$ 4-Integrin-Signalweg über NFAT gezeigt (Jauliac *et al.* 2002). Die Induktion der ATX-Expression und Aktivität über NFATc1 sowie die Steigerung der Migration von MCF-7-Zellen unter normoxischen Bedingungen zeigen, dass die Aktivierung des AhR-Signalweges die Weiterentwicklung des Mammakarzinoms durch den NFAT-Signalweg fördern kann; ein Mechanismus, der sicherlich in dieser Abfolge nicht bekannt war.

Es besteht zwischen der AhR- und der NFAT-Aktivierung bis heute nur ein kausaler Zusammenhang in der Literatur. Die Calcineurin-abhängige Wirkung von TCDD, die in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, impliziert eine Verbindung der TCDD- und CsA-vermittelten Effekten auf die Immunantwort. Die Calcineurin-abhängigen Effekte von TCDD sollten vergleichbare Symptome hervorrufen wie die, die nach CsA-Behandlung beobachtet werden können. CsA wird eingesetzt um die Abstoßung von Transplanten zu verhindern. CsA und TCDD sind beide immunsuppressive Substanzen, die Fehlfunktionen der Schilddrüse

induzieren (De Waal *et al.* 1997). CsA inhibiert die T-Zell-Aktivierung und stört die B-Zell-Antwort (Pollock *et al.* 1994). TCDD wirkt auf die CD<sup>4+</sup> und CD<sup>8+</sup> T-Zellen und führt zur Suppression der zytotoxischen T-Zellantwort (Kerkvliet *et al.* 2002). Studien an immundefizienten Mäusen (SCID) zeigten, dass diese Mäuse nach Transplantation von Immunzellen oder lymphoiden Gewebe sensitiv auf TCDD oder CsA reagieren. Beide Substanzen verringern z. B. die IgG-Expression (Pollock *et al.* 1994; Vos *et al.* 1997). Ein weiterer Zusammenhang wurde in fötalen Organkulturen der Schilddrüse beobachtet. Nach dem Passieren der Plazenta inhibieren TCDD und CsA im Embryo die Thymozytenreifung und reduzieren die Expression des Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-II-Moleküls in der Schilddrüse (Holladay *et al.* 1999). Weiterhin korreliert das Risiko an einem Non-Hodgkin's Lymphom zu erkranken mit der durch TCDD- oder CsA-verursachten Immunschwäche (Vineis *et al.* 1996). Außerdem verursachen TCDD und CsA einen nephrotoxischen Effekt (Abbott *et al.* 1987; Carvalho da Costa *et al.* 2003). Obwohl es derzeit nicht eindeutig gezeigt wurde, wie TCDD die Dephosphorylierung von NFAT direkt beeinflusst, ob über die Hemmung der Calcineurin, über dessen Aktivität oder über die Calcineurin-Proteinexpression, muß bei künftigen TCDD-Wirkungsuntersuchungen der Einfluß auf NFAT beachtet werden.

#### **4.4 Rolle von PHD2 in der Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -Signalweg**

Die in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Seifert *et al.* 2007). Wie in den Abschnitten 1.3.2 und 1.3.3 beschrieben, wird die Aktivierung des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges durch die PHD-vermittelte Hydroxylierung und anschließende Ubiquitinylierung inhibiert. PHD2 wurde als die wichtigste Isoform beschrieben, die unter normoxischen Bedingungen HIF-1 $\alpha$  für den Abbau markiert (Berra *et al.* 2003). Aufgrund dieser Ausgangssituation stellte sich die Frage, ob nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie PHD2 der Mediator der TCDD-vermittelten Reduktion der HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung ist. Für diese Untersuchungen wurde die humane Hepatom-Zelllinie HepG2 mitgeführt.

Hypoxie induziert die PHD2-Promotoraktivität (Abb. 3-20, Seite 66) und erhöht folgerichtig die Transkript- und Proteinmenge in MCF-7- und HepG2-Zellen (Abb. 3-20, Seite 66, Anhang Abschnitt 7.1.5. A, B, E). Außerdem wurde unter hypoxischen Bedingungen die Induktion der Transkription der beiden anderen PHD-Isoformen PHD1 und PHD3 beobachtet (Anhang Abschnitt 7.1.5. C, D). Die Induktion dieser drei PHD-Isoformen unter hypoxischen Bedingungen wurde bereits beschrieben (Aprelikova *et al.* 2004; del Peso *et al.* 2003; Erez *et al.* 2004). Diese Effekte wurden in der Literatur als negativer Rückkopplungsmechanismus interpretiert, um die vorhandene Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  unter hypoxischen Bedingungen zu inhibieren (Appelhoff *et al.* 2004; Aprelikova *et al.* 2004; Berra *et al.* 2003; D'Angelo *et*

*al.* 2003; Marxsen *et al.* 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden Zelllinien-spezifische Effekte des Lösungsmittels DMSO auf die PHD2-Proteinsynthese in MCF-7-Zellen erkannt. Busby und Koautoren (Busby *et al.* 1999) beschrieben den Einfluss von verschiedenen Lösungsmitteln auf die Cytochrom P450-Aktivität. Es konnte gezeigt werden, dass 0,3 % bis 3 % DMSO die Aktivität von CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4 inhibieren. Andere Lösungsmittel, wie z.B. Acetonitril, Ethanol oder Methanol, verursachen jedoch ähnliche oder sogar stärkere Effekte. Zusätzlich wurde DMSO sowohl als Inhibitor für die Expression verschiedener Proteine als auch als Aktivator für Enzymaktivitäten beschrieben (Tjernberg *et al.* 2006). Allerdings gibt es keine bessere Alternative für das Lösungsmittel DMSO, wenn TCDD als Supplement in Kulturmedien eingesetzt werden soll.

Die Expression von PHD2, dem Hauptregulator von HIF-1 $\alpha$ , wurde in MCF-7- und HepG2-Zellen durch TCDD AhR-abhängig induziert (vgl. Abschnitt 3.7, Seite 64-67). Jedoch führte die Aktivierung des AhR nicht zur Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$ . Eine Stimulation mit TCDD unter normoxischen Bedingungen induzierte die PHD2-Promotoraktivität (Abb. 3-20, Seite 66) sowie die Transkript- und Proteinmenge (Abb. 3-20, Seite 66, Anhang Abschnitt 7.1.5 A, B, E). Bekannt ist, dass PHD2 zwei Promotorregionen enthält. Die erste Region ist ungefähr 3,5 kb 5' vom Startkodon entfernt. Die zweite Promotorregion ist in einer CpG-Insel 5' der kodierenden Sequenz lokalisiert. Das in dieser Arbeit verwendete PHD2-Promotorkonstrukt enthält den zweiten Promotorbereich mit einem funktionellen Hypoxie-Response-Element (Metzen *et al.* 2005). Zusätzliche Promotoranalysen sollten klären, ob andere Response-Elemente in dieser Promotorregion die Aktivierung des PHD2-Promotors nach Aktivierung des AhR verursachen.

Nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie dominierte die TCDD-vermittelte HIF-1 $\alpha$ -Destabilisierung über die AhR-vermittelte Regulation der PHD2-Expression in beiden untersuchten Zelllinien (vgl. Abschnitt 3.7, Seite 64-67). Protein- und mRNA-Expression stimmten mit der beobachteten Reduktion der HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung unter diesen Bedingungen überein. Diese Daten korrelieren mit der Tatsache, dass PHD2 ein HIF-1 $\alpha$  Zielgen ist (Aprelikova *et al.* 2004).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PHD2 nicht der Mediator der Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -Signalweg ist. Während einer 6-stündigen Stimulation mit TCDD und Hypoxie ergab sich keine Änderung der PHD2-Proteinexpression (Anhang Abschnitt 7.1.5. F). Aus diesem Grund kann eine Kompensation der niedrigen Sauerstoffverfügbarkeit durch erhöhte PHD-Proteinmengen, wie von Stiehl und Koautoren unter anderen Bedingungen beschrieben (Stiehl *et al.* 2006), ausgeschlossen werden. Weiterhin wurde die ROS-Bildung in MCF-7- und HepG2-Zellen nach Stimulation mit TCDD und/oder

Hypoxie untersucht (Anhang Abschnitt 7.1.5. G). Hypoxie erhöht die ROS-Bildung (Chandel *et al.* 2000; Paddenberg *et al.* 2003). Der Fluoreszenzindikator H<sub>2</sub>DCFDA wurde in zahlreichen Studien zur Detektion der ROS-Bildung verwendet (Paddenberg *et al.* 2003; Wartenberg *et al.* 2003). ROS können die PHD2-Aktivität unter hypoxischen Bedingungen wiederherstellen (Callapina *et al.* 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie keine erhöhte Bildung von ROS im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Hypoxie in MCF-7- und HepG2-Zellen detektiert werden. ROS scheidet deshalb als interagierender Faktor mit der PHD2-Aktivität aus.

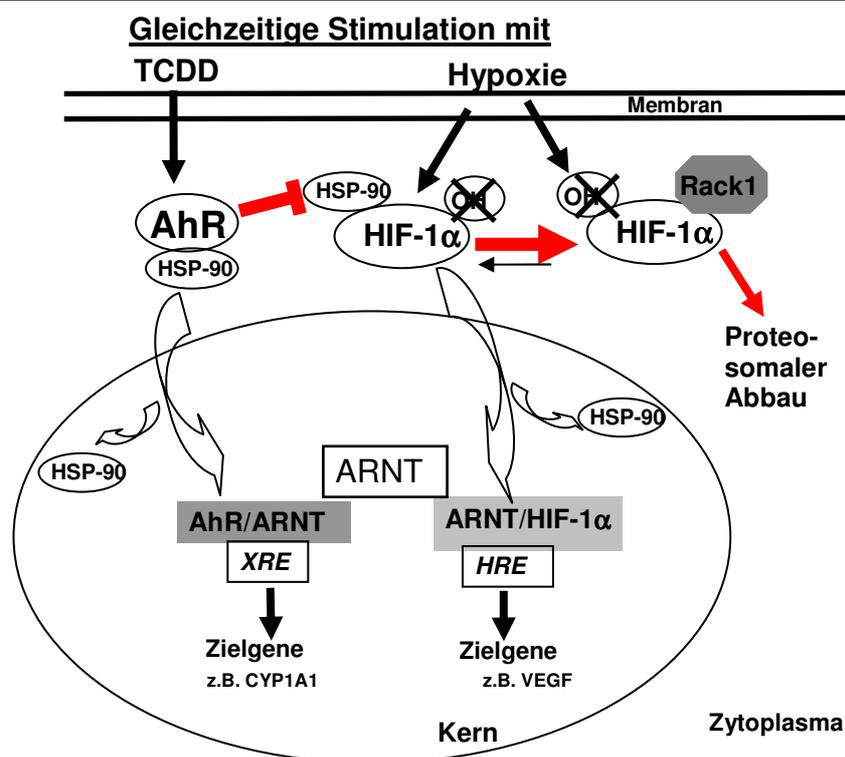
#### **4.5 Der Einfluss von Hsp90 und Rack1 auf die Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -Signalweg**

Die gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie verringerte die HSE- (Hitzeschock *Response*-Element) Promotoraktivität, die Hsp90-Transkript- sowie Proteinmenge (Abb. 3-21, Seite 68, Anhang Abschnitt 7.1.6. A). Die Expression von Hsp90 wird durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HSF (Hitzeschockfaktor) und dessen Bindung an das HSE erhöht (Beliakoff *et al.* 2004). Die Induktion von Hsp90 durch zahlreiche Substanzen, wie z. B. TGF $\beta$ , Östradiol, Insulin, IL-4, IL-6 und Phorbolster oder durch Hitzeschock wurde beschrieben (Csermely *et al.* 1998). Weiterhin gibt es Hinweise, dass die Inhibierung der PI3K die Expression von Hsp90 reduziert (Zhou *et al.* 2004). Der Inhibitor Geldanamycin reduziert die Hsp90-Expression spezifisch (Mabjeesh *et al.* 2002). Hsp90 ist ein molekulares Chaperon, das Proteine gegen fehlerhafte Faltung und aufgrund seiner ATPase-Aktivität gegen deren Abbau schützt (Neckers *et al.* 2003; Whitesell *et al.* 2005).

Die gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie verändert die Rack1-Expression nicht (Anhang Abschnitt 7.1.6. B). Rack1 wurde ursprünglich identifiziert als ein mit der aktivierten Proteinkinase C interagierendes Protein (Ron *et al.* 1994). In der aktuellen Literatur wird Rack1 als ein multifunktionelles Interaktionsprotein (*scaffold protein*) beschrieben. Das Protein spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen, z. B. während der intrazellulären Signaltransduktion (McCahill *et al.* 2002) und bei der Zusammensetzung der 80S-Ribosomen aus der 40S- und der 60S-Untereinheit (Ceci *et al.* 2003). Rack1 besitzt sieben WD40-Domänen, die aus 40 Wiederholungen der Aminosäuren Tryptophan und Aspartat bestehen (Steele *et al.* 2001). Rack1 kann über die vierte WD40-Domäne homodimerisieren. Außerdem wurde die sechste WD40-Domäne als minimale Bindungsstelle für HIF-1 $\alpha$  und Elongin C identifiziert (Thornton *et al.* 2004).

Die Konkurrenz von Hsp90 und Rack1 um HIF-1 $\alpha$  vermittelt den Sauerstoff-PHD-VHL-unabhängigen Abbau von HIF-1 $\alpha$ . Hsp90 interagiert mit HIF-1 $\alpha$  und inhibiert den Abbau des Komplexes (Katschinski *et al.* 2004). Die Interaktion zwischen Hsp90 und HIF-1 $\alpha$  bildet

einen potentiell instabilen Transkriptionsfaktorkomplex im Zytoplasma (Isaacs *et al.* 2002). Die Hsp90-Inhibitoren Geldanamycin und 17-Allylaminogeldanamycin (17-AAG) konkurrieren mit ATP um die Bindung von Hsp90 und zerstören die Interaktion von Hsp90 und HIF-1 $\alpha$  (Pearl *et al.* 2006). Die Folge ist der proteosomale Abbau von HIF-1 $\alpha$  auch in Abwesenheit des funktionellen Proteins VHL (Isaacs *et al.* 2002; Isaacs *et al.* 2004; Mabweesh *et al.* 2002). Im diesem Jahr wurde Rack1 als HIF-1 $\alpha$  interagierendes Protein beschrieben (Liu *et al.* 2007a). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die HIF-1 $\alpha$ -Proteinexpression und transkriptionelle Aktivität durch Rack1 verringert und durch die RACK1-Inhibierung mittels RNA-Interferenz erhöht wird. Die Rack1-vermittelte HIF-1 $\alpha$ -Inhibierung konnte dabei durch den Proteasominhibitor MG132 verhindert werden (Liu *et al.* 2007a). Zusätzlich konnten die Aminosäuren 81-200 von HIF-1 $\alpha$  als Minimalsequenz identifiziert werden, um die Bindung von Rack1 und Hsp90 zu ermöglichen. Liu und Koautoren (Liu *et al.* 2007b) nahmen aufgrund dieser Befunde an, dass Rack1-Dimere sowohl HIF-1 $\alpha$  als auch Elongin C binden können. Weiterhin konnten durch Sequenzanalysen die Aminosäuren 227-249 des humanen Rack1 und die Aminosäuren 155-178 des humanen Proteins VHL als konservierte Domänen identifiziert werden, die an Elongin C binden können (Liu *et al.* 2007b; Stebbins *et al.* 1999). Die Interaktion mit Rack1 wird ebenfalls für den proteosomalen Abbau eines anderen Transkriptionsfaktors  $\Delta$ Np63 benötigt (Fomenkov *et al.* 2004). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde von Liu *et al.* (Liu *et al.* 2007b) postuliert, dass Rack1 zur Familie der Erkennungseinheiten von E3-Ubiquitinligasen gehört.



**Abb. 4-2: Der Sauerstoff-PHD-VHL-unabhängige Abbau von HIF-1 $\alpha$  über das Protein Rack1 sowie die AhR-vermittelte, verringerte Hsp90-Expression nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie ist dargestellt. Aufgrund der verringerten Hsp90-Expression verschiebt sich das Gleichgewicht in der Konkurrenz um HIF-1 $\alpha$  in Richtung des Proteins Rack1 und damit zur HIF-1 $\alpha$ -Destabilisierung.**

Die Konkurrenz von Hsp90 und Rack1 um HIF-1 $\alpha$  verursacht die TCDD-vermittelte HIF-1 $\alpha$ -Destabilisierung und damit die Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -Signalweg (Abschnitt 3.8., Seite 67-72, Abb. 4-2). In dieser Arbeit konnte durch Inhibierung der Rack1-Expression mittels RNA-Interferenz die TCDD-vermittelte Reduktion der HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung unter hypoxischen Bedingungen verhindert werden (Abb. 3-23, Seite 71). Dazu wurde eine spezifische Rack1-siRNA verwendet. Die Verwendung von mehreren unterschiedlichen Rack1-siRNAs, um die Rack1-Expression stärker zu verringern, war bei diesen Untersuchungen nicht nötig. Es wird angenommen, dass nach Behandlung mit einer spezifischen Rack1-siRNA durch ähnliche Expressionsmengen von Hsp90 und Rack1 wieder ein Gleichgewicht in der Konkurrenz um HIF-1 $\alpha$  entstanden ist. Auf der Grundlage des Modells von Liu und Koautoren (Liu *et al.* 2007a; Liu *et al.* 2007b) und der im Abschnitt 3.8 beschriebenen Ergebnisse kann geschlossen werden, dass durch die verringerte Expression von Hsp90 der Sauerstoff-PHD-VHL-unabhängige Abbau von HIF-1 $\alpha$  über das Protein Rack1 nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie ermöglicht wird (siehe Abb. 4-2). Die HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung und transkriptionelle Aktivität wurde durch Einsatz der

Rack1-spezifischen im Vergleich zur nicht-spezifischen siRNA unter hypoxischen Bedingungen kaum verändert (Abb. 3-24, Seite 72). Es kann damit angenommen werden, dass das Gleichgewicht unter diesen Bedingungen auf der Seite von Hsp90 liegt. Im Ergebnis dieser Untersuchungen wird dadurch ein molekularer Interaktionsweg für die aktuell in der Literatur diskutierte Frage nach dem Mediator der Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -Signalweg aufgezeigt.

## 5 Zusammenfassung

Die lipophile Umweltchemikalie TCDD (2,3,7,8-Tetrachloro-dibenzo-*para*-dioxin, Dioxin) akkumuliert im Fettgewebe der Brust und aktiviert den Transkriptionsfaktor Arylhydrokarbonrezeptor (AhR). Im Falle eines Mammakarzinoms kommen heterogen über das Karzinom verteilte hypoxische Bereiche vor. Die molekularen Signalmechanismen, das Proteom und die maligne Progression des meist Hormon-abhängigen Mammakarzinoms können sowohl durch Hypoxie als auch durch xenobiotische Stressoren verändert werden. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -(Hypoxie-induzierter Faktor-1 $\alpha$ ) Signalweg und deren Auswirkungen auf den ER $\alpha$ -, p53- und NFATc1-Signalwege in der Brustkrebszelllinie MCF-7 zu untersuchen. Begleitend wurde eine Hepatozytenzelllinie (HepG2) für die Untersuchung der Interferenz mitgeführt, weil die Aktivierung des HIF-1 $\alpha$ -Signalweges in dieser Zelllinie sehr gut charakterisiert ist.

Die konzentrations- und zeitabhängige Aktivierung des AhR bzw. des HIF-1 $\alpha$  in MCF-7-Zellen zeigten, dass eine signifikante Induktion beider Signalwege durch 10 nM TCDD bzw. 5 % Sauerstoff (Hypoxie) nach 6 Stunden verursacht wird. Eine gleichzeitige Stimulation mit TCDD und Hypoxie reduziert die Aktivierung des AhR-Signalweges in HepG2-Zellen, jedoch nicht in MCF-7-Zellen. TCDD reduzierte in MCF-7- und HepG2-Zellen die HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung und transkriptionelle Aktivität unter hypoxischen Bedingungen, jedoch nicht unter normoxischen Bedingungen (Luftsauerstoff 20 % O<sub>2</sub>). Der AhR- und der HIF-1 $\alpha$ -Signalweg interferieren in MCF-7- und HepG2-Zellen.

Die Konsequenzen einer gemeinsamen Aktivierung des AhR- und HIF-1 $\alpha$ -Signalweges sind bis heute weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte in MCF-7-Zellen gezeigt werden, dass eine gleichzeitige Aktivierung des AhR- und HIF-1 $\alpha$ -Signalweges die p53-vermittelte transkriptionelle Aktivität und die Proteinexpression von p53 inhibiert. Dieser Effekt konnte auf eine gesteigerte Aktivität des Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) und die transkriptionelle Regulation von Hdm2 zurückgeführt werden. Die verringerte p53-vermittelte transkriptionelle Aktivität wurde anhand des p53-Zielgenes Dusp5 gezeigt. Die Inhibierung von Dusp5 durch RNA-Interferenz verhinderte die Dephosphorylierung des ER $\alpha$  und vermittelte eine erhöhte Phosphorylierung des Rezeptors durch ERK1/2. Dieser Effekt führte wiederum zur Induktion der ER $\alpha$ -Zielgene SOCS3 und Hdm2. Die gleichen Ergebnisse wurden nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie detektiert, was zeigt, dass die beiden Signalwege, wenn diese gleichzeitig aktiviert werden, die Aktivität des ER $\alpha$  steigern. Die Induktion der ERE-vermittelten Promotoraktivität konnte durch den MEK1-spezifischen Inhibitor PD98059 verhindert werden. Nach der PD98059-Inhibierung wurde die Hdm2-

Transkription nur minimal beeinflusst. Diese Ergebnisse zeigen, dass TCDD und Hypoxie im Signalnetzwerk oberhalb des MAPK/ERK-Signalweges agieren. Die Kombination einer Inhibierung des p53-Signalweges und die Induktion des ER $\alpha$ -Signalweges stellt einen neuen Mechanismus dar, wie TCDD, gezeigt am Modell der MCF-7-Zellen, unter hypoxischen, also tumorspezifischen Bedingungen die Weiterentwicklung des Brustkrebses fördern könnte.

In einer vor Beginn dieser Arbeit durchgeführten Mikroarray-Analyse wurde der Transkriptionsfaktor NFATc2 als TCDD- und Hypoxie-reguliertes Gen identifiziert. Durch Translokationsstudien des zu NFATc2 hochhomologen Proteins NFATc1 konnte in MCF-7-Zellen gezeigt werden, dass der AhR- und der HIF-1 $\alpha$ -Signalweg die Aktivierung des NFATc1 Calcineurin-abhängig induzierte. Diese Aktivierung resultierte in der Induktion der Expression und Aktivität des NFAT-Zielgenes Autotaxin (ATX). Weiterhin induzierte TCDD unter normoxischen Bedingungen die Migration von MCF-7- Zellen über das enzymatische Produkt von Autotaxin, LPA. Hypoxie dagegen induzierte die ATX-Aktivität, allerdings nicht die Migration der MCF-7-Zellen. Dies impliziert, dass die ATX- bzw. LPA-induzierten Signalwege durch im Signalweg nachfolgende Proteine unter hypoxischen Bedingungen blockiert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung des AhR-Signalweges die Metastasierung des Mammakarzinoms durch den NFATc1-Signalweg fördert.

Nach der Untersuchung der Konsequenzen einer Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie stellte sich die Frage, welcher Faktor die Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -Signalweg vermittelt. Zunächst wurde das Protein PHD2 untersucht, welches durch die Hydroxylierung von HIF-1 $\alpha$  der Hauptregulator dieses Signalweges ist. Die Regulation der PHD2-Expression und -Aktivität wurde in MCF-7- und HepG2-Zellen unter den bekannten Bedingungen der Einzel- und Doppelstimulation untersucht. Sollte PHD2 der Mediator der TCDD-vermittelten HIF-1 $\alpha$ -Destabilisierung sein, müßte die PHD2-Expression im Vergleich zur Induktion unter hypoxischen Bedingungen nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie zusätzlich induziert werden. Es konnte in beiden Zelllinien gezeigt werden, dass TCDD die PHD2-Expression AhR-abhängig induzierte. Nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie wurde die PHD2-Expression durch die TCDD-vermittelte HIF-1 $\alpha$ -Destabilisierung dominiert und nicht über die AhR-vermittelte Mechanismen in MCF-7- und HepG2-Zellen reguliert. Die PHD2-Expression wurde innerhalb einer 6-stündigen Stimulation mit TCDD und Hypoxie nicht induziert. Nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie wurde ebenfalls keine erhöhte ROS-Bildung im Vergleich zur Einzelstimulation mit Hypoxie detektiert. Somit konnte die Erhöhung der PHD2-Aktivität durch eine erhöhte ROS-Bildung ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse

zeigen, dass PHD2 nicht als Vermittler der Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -Signalweg in Frage kommt.

Anschließend wurden das Protein Hsp90 als möglicher Mediator untersucht. In der Literatur wurde ein Sauerstoff-unabhängiger Abbau durch den Hsp90-spezifischen Inhibitor 17-Allylamino-geldanamycin über die Konkurrenz zwischen Hsp90 und Rack1 um HIF-1 $\alpha$  gezeigt. Der HIF-1 $\alpha$ -Stabilisator Hsp90 wurde nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie geringer exprimiert, während die Expression des Proteins Rack1 unverändert blieb. Über die Inhibierung von Rack1 mittels siRNA wurde nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie die TCDD-vermittelte HIF-1 $\alpha$ -Destabilisierung verhindert. Diese Ergebnisse zeigen, dass in MCF-7-Zellen nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie durch die Inhibierung von Hsp90 der Sauerstoff-PHD-VHL-unabhängige Abbau von HIF-1 $\alpha$  über das Protein Rack1 vermittelt wurde. Die Konkurrenz von Hsp90 und Rack1 um HIF-1 $\alpha$  vermittelt die Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -Signalweg. Diese Konkurrenz bietet eine Erklärung und Antwort für die gestellte Frage nach einem Vermittler für Interferenz und Auswirkungen zwischen den beiden Signalwegen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abbott, B.D., Birnbaum, L.S., Pratt, R.M. (1987). TCDD-induced hyperplasia of the ureteral epithelium produces hydronephrosis in murine fetuses. *Teratology*. 35: 329-34.
- Abdelrahim, M., Smith, R., 3rd, Safe, S. (2003). Aryl hydrocarbon receptor gene silencing with small inhibitory RNA differentially modulates Ah-responsiveness in MCF-7 and HepG2 cancer cells. *Mol Pharmacol* 63 (6): 1373-81.
- Abraham, K., Knoll, A., Ende, M., Papke, O., Helge, H. (1996). Intake, fecal excretion, and body burden of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in breast-fed and formula-fed infants. *Pediatr Res* 40 (5): 671-9.
- Acker, T., Fandrey, J., Acker, H. (2006). The good, the bad and the ugly in oxygen-sensing: ROS, cytochromes and prolyl-hydroxylases. *Cardiovasc Res* 71 (2): 195-207.
- Adachi, J., Mori, Y., Matsui, S., Takigami, H., Fujino, J., Kitagawa, H., Miller, C.A., 3rd, Kato, T., Saeki, K., Matsuda, T. (2001). Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J Biol Chem* 276 (34): 31475-8.
- Amaral Mendes, J.J. (2002). The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food Chem Toxicol* 40 (6): 781-8.
- Andreasen, E.A., Tanguay, R.L., Peterson, R.E., Heideman, W. (2002). Identification of a critical amino acid in the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 277 (15): 13210-8.
- Aoki, J., Taira, A., Takanezawa, Y., Kishi, Y., Hama, K., Kishimoto, T., Mizuno, K., Saku, K., Taguchi, R., Arai, H. (2002). Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem* 277 (50): 48737-44.
- Appelhoff, R.J., Tian, Y.M., Raval, R.R., Turley, H., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Gleadle, J.M. (2004). Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 279 (37): 38458-65.
- Aprelikova, O., Chandramouli, G.V., Wood, M., Vasselli, J.R., Riss, J., Maranchie, J.K., Linehan, W.M., Barrett, J.C. (2004). Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *J Cell Biochem* 92 (3): 491-501.
- Atkinson, R. (1991). Atmospheric lifetimes of dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Sci Total Environ* 104 (1-2): 17-33.
- Azzena, A., Zen, T., Ferrara, A., Brunetti, V., Vasile, C., Marchetti, M. (1994). Risk factors for breast cancer. Case-control study results. *Eur J Gynaecol Oncol* 15 (5): 386-92.
- Baba, T., Mimura, J., Gradin, K., Kuroiwa, A., Watanabe, T., Matsuda, Y., Inazawa, J., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y. (2001). Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J Biol Chem* 276 (35): 33101-10.
- Bachelder, R.E., Crago, A., Chung, J., Wendt, M.A., Shaw, L.M., Robinson, G., Mercurio, A.M. (2001). Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res* 61 (15): 5736-40.
- Backlund, M., Ingelman-Sundberg, M. (2004). Different structural requirements of the ligand binding domain of the aryl hydrocarbon receptor for high- and low-affinity ligand binding and receptor activation. *Mol Pharmacol* 65 (2): 416-25.
- Bacsi, S.G., Hankinson, O. (1996). Functional characterization of DNA-binding domains of the subunits of the heterodimeric aryl hydrocarbon receptor complex imputing novel and canonical basic helix-loop-helix protein-DNA interactions. *J Biol Chem* 271 (15): 8843-50.
- Bacsi, S.G., Reisz-Porszasz, S., Hankinson, O. (1995). Orientation of the heterodimeric aryl hydrocarbon (dioxin) receptor complex on its asymmetric DNA recognition sequence. *Mol Pharmacol* 47 (3): 432-8.
- Bando, H., Toi, M., Kitada, K., Koike, M. (2003). Genes commonly upregulated by hypoxia in human breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231. *Biomed Pharmacother* 57 (8): 333-40.
- Bardos, J.I., Ashcroft, M. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. *Bioessays* 26 (3): 262-9.
- Beck, I., Ramirez, S., Weinmann, R., Caro, J. (1991). Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene. *J Biol Chem* 266 (24): 15563-6.
- Behnisch, P.A., Hosoe, K., Sakai, S. (2001). Combinatorial bio/chemical analysis of dioxin and dioxin-like compounds in waste recycling, feed/food, humans/wildlife and the environment. *Environ Int* 27 (6): 495-519.
- Beischlag, T.V., Wang, S., Rose, D.W., Torchia, J., Reisz-Porszasz, S., Muhammad, K., Nelson, W.E., Probst, M.R., Rosenfeld, M.G., Hankinson, O. (2002). Recruitment of the NCoA/SRC-1/p160 family of transcriptional coactivators by the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator complex. *Mol Cell Biol* 22 (12): 4319-33.
- Beliakoff, J., Whitesell, L. (2004). Hsp90: an emerging target for breast cancer therapy. *Anticancer Drugs* 15 (7): 651-62.

- Bernshausen, T., Jux, B., Esser, C., Abel, J., Fritsche, E. (2005). Tissue distribution and function of the Aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) in C57BL/6 and Aryl hydrocarbon receptor deficient mice. *Arch Toxicol*: 1-6.
- Berra, E., Benizri, E., Ginouves, A., Volmat, V., Roux, D., Pouyssegur, J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *Embo J* 22 (16): 4082-90.
- Berra, E., Ginouves, A., Pouyssegur, J. (2006). The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep* 7 (1): 41-5.
- Bertazzi, P.A., Consonni, D., Bachetti, S., Rubagotti, M., Baccarelli, A., Zocchetti, C., Pesatori, A.C. (2001). Health effects of dioxin exposure: a 20-year mortality study. *Am J Epidemiol* 153 (11): 1031-44.
- Biegel, L., Safe, S. (1990). Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on cell growth and the secretion of the estrogen-induced 34-, 52- and 160-kDa proteins in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37 (5): 725-32.
- Birnbaum, L.S., Tuomisto, J. (2000). Non-carcinogenic effects of TCDD in animals. *Food Addit Contam* 17 (4): 275-88.
- Black, E.J., Clair, T., Delrow, J., Neiman, P., Gillespie, D.A. (2004). Microarray analysis identifies Autotaxin, a tumour cell motility and angiogenic factor with lysophospholipase D activity, as a specific target of cell transformation by v-Jun. *Oncogene* 23 (13): 2357-66.
- Blumenthal, D.K., Takio, K., Hansen, R.S., Krebs, E.G. (1986). Dephosphorylation of cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit (type II) by calmodulin-dependent protein phosphatase. Determinants of substrate specificity. *J Biol Chem* 261 (18): 8140-5.
- Bond, G.L., Hirshfield, K.M., Kirchoff, T., Alexe, G., Bond, E.E., Robins, H., Bartel, F., Taubert, H., Wuerl, P., Hait, W., Toppmeyer, D., Offit, K., Levine, A.J. (2006). MDM2 SNP309 accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner. *Cancer Res* 66 (10): 5104-10.
- Bond, G.L., Hu, W., Bond, E.E., Robins, H., Lutzker, S.G., Arva, N.C., Bargonetti, J., Bartel, F., Taubert, H., Wuerl, P., Onel, K., Yip, L., Hwang, S.J., Strong, L.C., Lozano, G., Levine, A.J. (2004). A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* 119 (5): 591-602.
- Bos, R., van Diest, P.J., van der Groep, P., Shvarts, A., Greijer, A.E., van der Wall, E. (2004). Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and cell cycle proteins in invasive breast cancer are estrogen receptor related. *Breast Cancer Res* 6 (4): R450-9.
- Bos, R., Zhong, H., Hanrahan, C.F., Mommers, E.C., Semenza, G.L., Pinedo, H.M., Abeloff, M.D., Simons, J.W., van Diest, P.J., van der Wall, E. (2001). Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 93 (4): 309-14.
- Boucher, J., Quilliot, D., Praderes, J.P., Simon, M.F., Gres, S., Guigne, C., Prevot, D., Ferry, G., Boutin, J.A., Carpenne, C., Valet, P., Saulnier-Blache, J.S. (2005). Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression. *Diabetologia* 48 (3): 569-77.
- Boyle, P., Ferlay, J. (2005). Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 16 (3): 481-8.
- Bradfield, C.A., Kende, A.S., Poland, A. (1988). Kinetic and equilibrium studies of Ah receptor-ligand binding: use of [125I]2-iodo-7,8-dibromodibenzo-p-dioxin. *Mol Pharmacol* 34 (2): 229-37.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brody, J.G., Rudel, R.A. (2003). Environmental pollutants and breast cancer. *Environ Health Perspect* 111 (8): 1007-19.
- Busby, W.F., Jr., Ackermann, J.M., Crespi, C.L. (1999). Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos* 27 (2): 246-9.
- Butler, E.T., Chamberlin, M.J. (1982). Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase. I. Isolation and characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 257 (10): 5772-8.
- Callapina, M., Zhou, J., Schmid, T., Kohl, R., Brune, B. (2005). NO restores HIF-1alpha hydroxylation during hypoxia: role of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 39 (7): 925-36.
- Carlson, D.B., Perdew, G.H. (2002). A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. *J Biochem Mol Toxicol* 16 (6): 317-25.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C.J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R.K., Collen, D., Keshert, E. (1998). Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394 (6692): 485-90.
- Carvalho da Costa, M., de Castro, I., Neto, A.L., Ferreira, A.T., Burdmann, E.A., Yu, L. (2003). Cyclosporin A tubular effects contribute to nephrotoxicity: role for Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> ions. *Nephrol Dial Transplant*. 18: 2262-8.

- Carver, L.A., Bradfield, C.A. (1997). Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem* 272 (17): 11452-6.
- Ceci, M., Gaviraghi, C., Gorrini, C., Sala, L.A., Offenhauser, N., Marchisio, P.C., Biffo, S. (2003). Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* 426 (6966): 579-84.
- Chan, W.K., Yao, G., Gu, Y.Z., Bradfield, C.A. (1999). Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. Demonstration of competition and compensation. *J Biol Chem* 274 (17): 12115-23.
- Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M., Schumacker, P.T. (2000). Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *J Biol Chem* 275 (33): 25130-8.
- Chang, C.Y., Puga, A. (1998). Constitutive activation of the aromatic hydrocarbon receptor. *Mol Cell Biol* 18 (1): 525-35.
- Chen, D., Li, M., Luo, J., Gu, W. (2003). Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *J Biol Chem* 278 (16): 13595-8.
- Chen, M., O'Connor, K.L. (2005). Integrin alpha6beta4 promotes expression of autotaxin/ENPP2 autocrine motility factor in breast carcinoma cells. *Oncogene* 24 (32): 5125-30.
- Cho, J., Bahn, J.J., Park, M., Ahn, W., Lee, Y.J. (2006). Hypoxic activation of unoccupied estrogen-receptor-alpha is mediated by hypoxia-inducible factor-1 alpha. *J Steroid Biochem Mol Biol* 100 (1-3): 18-23.
- Cho, J., Kim, D., Lee, S., Lee, Y. (2005). Cobalt chloride-induced estrogen receptor alpha down-regulation involves hypoxia-inducible factor-1alpha in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 19 (5): 1191-9.
- Choi, K.S., Bae, M.K., Jeong, J.W., Moon, H.E., Kim, K.W. (2003). Hypoxia-induced angiogenesis during carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol* 36 (1): 120-7.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 (1): 156-9.
- Chun, Y.S., Kim, M.S., Park, J.W. (2002). Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1alpha. *J Korean Med Sci* 17 (5): 581-8.
- Cioffi, C.L., Liu, X.Q., Kosinski, P.A., Garay, M., Bowen, B.R. (2003). Differential regulation of HIF-1 alpha prolyl-4-hydroxylase genes by hypoxia in human cardiovascular cells. *Biochem Biophys Res Commun* 303 (3): 947-53.
- Clair, T., Lee, H.Y., Liotta, L.A., Stracke, M.L. (1997). Autotaxin is an exoenzyme possessing 5'-nucleotide phosphodiesterase/ATP pyrophosphatase and ATPase activities. *J Biol Chem* 272 (2): 996-1001.
- Comerford, K.M., Cummins, E.P., Taylor, C.T. (2004). c-Jun NH2-terminal kinase activation contributes to hypoxia-inducible factor 1alpha-dependent P-glycoprotein expression in hypoxia. *Cancer Res* 64 (24): 9057-61.
- Corley, K.M., Taylor, C.J., Lilly, B. (2005). Hypoxia-inducible factor 1alpha modulates adhesion, migration, and FAK phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *J Cell Biochem* 96 (5): 971-85.
- Courtney, K.D., Moore, J.A. (1971). Teratology studies with 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 20 (3): 396-403.
- Cox, M.B., Miller, C.A., 3rd (2003). Pharmacological and genetic analysis of 90-kDa heat shock isoprotein-aryl hydrocarbon receptor complexes. *Mol Pharmacol* 64 (6): 1549-56.
- Crabtree, G.R., Olson, E.N. (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 Suppl: S67-79.
- Crocker, B.A., Krebs, D.L., Zhang, J.G., Wormald, S., Willson, T.A., Stanley, E.G., Robb, L., Greenhalgh, C.J., Forster, I., Clausen, B.E., Nicola, N.A., Metcalf, D., Hilton, D.J., Roberts, A.W., Alexander, W.S. (2003). SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol* 4 (6): 540-5.
- Csermely, P., Schneider, T., Soti, C., Prohaszka, Z., Nardai, G. (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 79 (2): 129-68.
- D'Angelo, G., Duplan, E., Boyer, N., Vigne, P., Frelin, C. (2003). Hypoxia up-regulates prolyl hydroxylase activity: a feedback mechanism that limits HIF-1 responses during reoxygenation. *J Biol Chem* 278 (40): 38183-7.
- Dann, C.E., 3rd, Bruick, R.K., Deisenhofer, J. (2002). Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1: An asparaginyl hydroxylase involved in the hypoxic response pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (24): 15351-6.
- Davarinos, N.A., Pollenz, R.S. (1999). Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J Biol Chem* 274 (40): 28708-15.

- Davidson, T., Salnikow, K., Costa, M. (2003). Hypoxia inducible factor-1 alpha-independent suppression of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by nickel. *Mol Pharmacol* 64 (6): 1485-93.
- Dawson, T.M., Steiner, J.P., Dawson, V.L., Dinerman, J.L., Uhl, G.R., Snyder, S.H. (1993). Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (21): 9808-12.
- De Waal, E.J., Schuurman, H.J., Van Loveren, H., Vos, J.G. (1997). Differential effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, bis(tri-n-butyltin) oxide and cyclosporine on thymus histophysiology. *Crit Rev Toxicol*. 27: 381-430.
- del Peso, L., Castellanos, M.C., Temes, E., Martin-Puig, S., Cuevas, Y., Olmos, G., Landazuri, M.O. (2003). The von Hippel Lindau/hypoxia-inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen. *J Biol Chem* 278 (49): 48690-5.
- Denison, M.S., Fisher, J.M., Whitlock, J.P., Jr. (1988). The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. *J Biol Chem* 263 (33): 17221-4.
- Denison, M.S., Nagy, S.R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 309-34.
- DePasquale, J.A. (1999). Rearrangement of the F-actin cytoskeleton in estradiol-treated MCF-7 breast carcinoma cells. *Histochem Cell Biol* 112 (5): 341-50.
- Dhingra, K., Hittelman, W.N., Hortobagyi, G.N. (1995). Genetic changes in breast cancer--consequences for therapy? *Gene* 159 (1): 59-63.
- Duan, R., Porter, W., Samudio, I., Vyhlidal, C., Kladde, M., Safe, S. (1999). Transcriptional activation of c-fos protooncogene by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol Endocrinol* 13 (9): 1511-21.
- Dumitrescu, R.G., Cotarla, I. (2005). Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med* 9 (1): 208-21.
- Dyer, B.W., Ferrer, F.A., Klinedinst, D.K., Rodriguez, R. (2000). A noncommercial dual luciferase enzyme assay system for reporter gene analysis. *Anal Biochem* 282 (1): 158-61.
- El Awad, B., Kreft, B., Wolber, E.M., Hellwig-Burgel, T., Metzen, E., Fandrey, J., Jelkmann, W. (2000). Hypoxia and interleukin-1beta stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tubular cells. *Kidney Int* 58 (1): 43-50.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 (6836): 494-8.
- el-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* 1 (1): 45-9.
- Ema, M., Ohe, N., Suzuki, M., Mimura, J., Sogawa, K., Ikawa, S., Fujii-Kuriyama, Y. (1994). Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors. *J Biol Chem* 269 (44): 27337-43.
- Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.M., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J., Ratcliffe, P.J. (2001). *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107 (1): 43-54.
- Erez, N., Stambolsky, P., Shats, I., Milyavsky, M., Kachko, T., Rotter, V. (2004). Hypoxia-dependent regulation of PHD1: cloning and characterization of the human PHD1/EGLN2 gene promoter. *FEBS Lett* 567 (2-3): 311-5.
- Eskenazi, B., Mocarelli, P., Warner, M., Needham, L., Patterson, D.G., Jr., Samuels, S., Turner, W., Gerthoux, P.M., Brambilla, P. (2004). Relationship of serum TCDD concentrations and age at exposure of female residents of Seveso, Italy. *Environ Health Perspect* 112 (1): 22-7.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (21): 7413-7.
- Felgner, P.L., Ringold, G.M. (1989). Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 337 (6205): 387-8.
- Fels, D.R., Koumenis, C. (2005). HIF-1alpha and p53: the ODD couple? *Trends Biochem Sci* 30 (8): 426-9.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391 (6669): 806-11.
- Fletcher, N., Wahlstrom, D., Lundberg, R., Nilsson, C.B., Nilsson, K.C., Stockling, K., Hellmold, H., Hakansson, H. (2005). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters the mRNA expression of critical genes associated with cholesterol metabolism, bile acid biosynthesis, and bile transport in rat liver: a microarray study. *Toxicol Appl Pharmacol* 207 (1): 1-24.

- Fomenkov, A., Zangen, R., Huang, Y.P., Osada, M., Guo, Z., Fomenkov, T., Trink, B., Sidransky, D., Ratovitski, E.A. (2004). RACK1 and stratifin target DeltaNp63alpha for a proteasome degradation in head and neck squamous cell carcinoma cells upon DNA damage. *Cell Cycle* 3 (10): 1285-95.
- Freeman, R.S., Hasbani, D.M., Lipscomb, E.A., Straub, J.A., Xie, L. (2003). SM-20, EGL-9, and the EGLN family of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylases. *Mol Cells* 16 (1): 1-12.
- Frenski, R., Pätzold, C. (2002). *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, Walter de Gruyter GmbH.
- Fruman, D.A., Burakoff, S.J., Bierer, B.E. (1994). Immunophilins in protein folding and immunosuppression.
- Fujii-Kuriyama, Y., Mimura, J. (2005). Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun* 338 (1): 311-7.
- Fukuba, H., Yamashita, H., Nagano, Y., Jin, H.G., Hiji, M., Ohtsuki, T., Takahashi, T., Kohriyama, T., Matsumoto, M. (2007). Siah-1 facilitates ubiquitination and degradation of factor inhibiting HIF-1alpha (FIH). *Biochem Biophys Res Commun* 353 (2): 324-9.
- Fukunaga, B.N., Probst, M.R., Reisz-Porszasz, S., Hankinson, O. (1995). Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 270 (49): 29270-8.
- Fürst, P. (1998). *Dioxine in Lebensmitteln*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Gao, N., Nester, R.A., Sarkar, M.A. (2004). 4-Hydroxy estradiol but not 2-hydroxy estradiol induces expression of hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor A through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/FRAP pathway in OVCAR-3 and A2780-CP70 human ovarian carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 196 (1): 124-35.
- Gardner, L.B., Li, Q., Park, M.S., Flanagan, W.M., Semenza, G.L., Dang, C.V. (2001). Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *J Biol Chem* 276 (11): 7919-26.
- Gasiewicz, T.A., Kende, A.S., Rucci, G., Whitney, B., Willey, J.J. (1996). Analysis of structural requirements for Ah receptor antagonist activity: ellipticines, flavones, and related compounds. *Biochem Pharmacol* 52 (11): 1787-803.
- Gassmann, M., Kvietikova, I., Rolfs, A., Wenger, R.H. (1997). Oxygen- and dioxin-regulated gene expression in mouse hepatoma cells. *Kidney Int* 51 (2): 567-74.
- Geyer, H., Scheunert, I., Korte, F. (1986). Bioconcentration potential of organic environmental chemicals in humans. *Regul Toxicol Pharmacol* 6 (4): 313-47.
- Giatromanolaki, A., Koukourakis, M.I., Sowter, H.M., Sivridis, E., Gibson, S., Gatter, K.C., Harris, A.L. (2004). BNIP3 expression is linked with hypoxia-regulated protein expression and with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10 (16): 5566-71.
- Gillesby, B.E., Stanostefano, M., Porter, W., Safe, S., Wu, Z.F., Zacharewski, T.R. (1997). Identification of a motif within the 5' regulatory region of pS2 which is responsible for AP-1 binding and TCDD-mediated suppression. *Biochemistry* 36 (20): 6080-9.
- Goda, N., Ryan, H.E., Khadivi, B., McNulty, W., Rickert, R.C., Johnson, R.S. (2003). Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol Cell Biol* 23 (1): 359-69.
- Goerke, K., Valet, A. (2002). *Gynäkologie und Geburtshilfe*, Urban & Fischer Verlag.
- Goryo, K., Suzuki, A., Carpio, C.A., Siizaki, K., Kuriyama, E., Mikami, Y., Kinoshita, K., Yasumoto, K., Rannug, A., Miyamoto, A., Fujii-Kuriyama, Y., Sogawa, K. (2007). Identification of amino acid residues in the Ah receptor involved in ligand binding. *Biochem Biophys Res Commun* 354 (2): 396-402.
- Gradin, K., McGuire, J., Wenger, R.H., Kvietikova, I., Whitelaw, M.L., Toftgard, R., Tora, L., Gassmann, M., Poellinger, L. (1996). Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol* 16 (10): 5221-31.
- Graef, I.A., Chen, F., Crabtree, G.R. (2001). NFAT signaling in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 11 (5): 505-12.
- Graham, F.L., van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52 (2): 456-67.
- Gray, L.E., Jr., Kelce, W.R. (1996). Latent effects of pesticides and toxic substances on sexual differentiation of rodents. *Toxicol Ind Health* 12 (3-4): 515-31.
- Gribble, G.W. (1998). Chlorinated compounds in the Biosphere, natural production, *Encyclopedia Environment analys remediation*, John Wiley & Sons, Inc.
- Hall, J.M., Couse, J.F., Korach, K.S. (2001). The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 276 (40): 36869-72.
- Hanlon, P.R., Zheng, W., Ko, A.Y., Jefcoate, C.R. (2005). Identification of novel TCDD-regulated genes by microarray analysis. *Toxicol Appl Pharmacol* 202 (3): 215-28.
- Hannon, G.J. (2002). RNA interference. *Nature* 418 (6894): 244-51.
- Harlow, G.R., Halpert, J.R. (1997). Alanine-scanning mutagenesis of a putative substrate recognition site in human cytochrome P450 3A4. Role of residues 210 and 211 in flavonoid activation and substrate specificity. *J Biol Chem* 272 (9): 5396-402.

- Heath-Pagliuso, S., Rogers, W.J., Tullis, K., Seidel, S.D., Ceniijn, P.H., Brouwer, A., Denison, M.S. (1998). Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry* 37 (33): 11508-15.
- Hellwig-Burgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J., Jelkmann, W. (1999). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 94 (5): 1561-7.
- Henderson, B.E., Ross, R., Bernstein, L. (1988). Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res* 48 (2): 246-53.
- Henry, E.C., Gasiewicz, T.A. (2003). Agonist but not antagonist ligands induce conformational change in the mouse aryl hydrocarbon receptor as detected by partial proteolysis. *Mol Pharmacol* 63 (2): 392-400.
- Henry, E.C., Kende, A.S., Rucci, G., Totleben, M.J., Willey, J.J., Dertinger, S.D., Pollenz, R.S., Jones, J.P., Gasiewicz, T.A. (1999). Flavone antagonists bind competitively with 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) to the aryl hydrocarbon receptor but inhibit nuclear uptake and transformation. *Mol Pharmacol* 55 (4): 716-25.
- Hirota, K., Semenza, G.L. (2005). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun* 338 (1): 610-6.
- Hockel, M., Vaupel, P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 93 (4): 266-76.
- Hofer, T., Pohjanvirta, R., Spielmann, P., Viluksela, M., Buchmann, D.P., Wenger, R.H., Gassmann, M. (2004). Simultaneous exposure of rats to dioxin and carbon monoxide reduces the xenobiotic but not the hypoxic response. *Biol Chem* 385 (3-4): 291-4.
- Holladay, S.D. (1999). Prenatal immunotoxicant exposure and postnatal autoimmune disease. *Environ Health Perspect*.
- Hombach-Klonisch, S., Pocar, P., Kauffold, J., Klonisch, T. (2006). Dioxin Exerts Anti-estrogenic Actions in a Novel Dioxin-Responsive Telomerase-Immortalized Epithelial Cell Line of the Porcine Oviduct (TERT-OPEC). *Toxicol Sci* 90 (2): 519-28.
- Hon, W.C., Wilson, M.I., Harlos, K., Claridge, T.D., Schofield, C.J., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Ratcliffe, P.J., Stuart, D.I., Jones, E.Y. (2002). Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature* 417 (6892): 975-8.
- Horn, H.F., Vousden, K.H. (2007). Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* 26 (9): 1306-16.
- Huai, Q., Kim, H.Y., Liu, Y., Zhao, Y., Mondragon, A., Liu, J.O., Ke, H. (2002). Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (19): 12037-42.
- Huang, J., Zhao, Q., Mooney, S.M., Lee, F.S. (2002). Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem* 277 (42): 39792-800.
- Hutvagner, G., Zamore, P.D. (2002). RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 12 (2): 225-32.
- Huuskonen, H., Unkila, M., Pohjanvirta, R., Tuomisto, J. (1994). Developmental toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the most TCDD-resistant and -susceptible rat strains. *Toxicol Appl Pharmacol* 124 (2): 174-80.
- IARC (1997). IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Polychlorinated Dibenzo-Para-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans. Lyon, France, 4-11 February 1997. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 69: 1-631.
- Ikeda, K., Inoue, S. (2004). Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. *Arch Histol Cytol* 67 (5): 435-42.
- Ikuta, T., Eguchi, H., Tachibana, T., Yoneda, Y., Kawajiri, K. (1998). Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 273 (5): 2895-904.
- Ikuta, T., Kobayashi, Y., Kawajiri, K. (2004). Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 317 (2): 545-50.
- Inouye, K., Ito, T., Fujimaki, H., Takahashi, Y., Takemori, T., Pan, X., Tohyama, C., Nohara, K. (2003). Suppressive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the high-affinity antibody response in C57BL/6 mice. *Toxicol Sci* 74 (2): 315-24.
- Isaacs, J.S., Jung, Y.J., Mimnaugh, E.G., Martinez, A., Cuttitta, F., Neckers, L.M. (2002). Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. *J Biol Chem* 277 (33): 29936-44.
- Isaacs, J.S., Jung, Y.J., Neckers, L. (2004). Aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) promotes oxygen-independent stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha by modulating an Hsp90-dependent regulatory pathway. *J Biol Chem* 279 (16): 16128-35.

- Ishimura, R., Ohsako, S., Kawakami, T., Sakae, M., Aoki, Y., Tohyama, C. (2002). Altered protein profile and possible hypoxia in the placenta of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-exposed rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 185 (3): 197-206.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., Kaelin, W.G., Jr. (2001). HIF-1 $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* 292 (5516): 464-8.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. (2001). Targeting of HIF-1 $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292 (5516): 468-72.
- Jackson, A.L., Bartz, S.R., Schelter, J., Kobayashi, S.V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., Linsley, P.S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21 (6): 635-7.
- Jain, J., McCaffrey, P.G., Miner, Z., Kerppola, T.K., Lambert, J.N., Verdine, G.L., Curran, T., Rao, A. (1993). The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* 365 (6444): 352-5.
- Jain, S., Dolwick, K.M., Schmidt, J.V., 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 (50): 31518-24.
- Jakoby, W.B., Ziegler, D.M. (1990). The enzymes of detoxication. *J Biol Chem* 265 (34): 20715-8.
- Jauliac, S., Lopez-Rodriguez, C., Shaw, L.M., Brown, L.F., Rao, A., Toker, A. (2002). The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat Cell Biol* 4 (7): 540-4.
- Jenkins, S., Rowell, C., Wang, J., Lamartiniere, C.A. (2006). Prenatal TCDD exposure predisposes for mammary cancer in rats. *Reprod Toxicol*.
- Jensen, B.A., Leeman, R.J., Schlezinger, J.J., Sherr, D.H. (2003). Aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonists suppress interleukin-6 expression by bone marrow stromal cells: an immunotoxicology study. *Environ Health* 2 (1): 16.
- Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H., Yoo, M.A., Song, E.J., Lee, K.J., Kim, K.W. (2002). Regulation and destabilization of HIF-1 $\alpha$  by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111 (5): 709-20.
- Jiang, B.H., Jiang, G., Zheng, J.Z., Lu, Z., Hunter, T., Vogt, P.K. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ* 12 (7): 363-9.
- Jin, L., Harrison, S.C. (2002). Crystal structure of human calcineurin complexed with cyclosporin A and human cyclophilin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (21): 13522-6.
- Joel, P.B., Traish, A.M., Lannigan, D.A. (1998). Estradiol-induced phosphorylation of serine 118 in the estrogen receptor is independent of p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273 (21): 13317-23.
- Jones, K.W., Whitlock, J.P., Jr. (1990). Functional analysis of the transcriptional promoter for the CYP1A1 gene. *Mol Cell Biol* 10 (10): 5098-105.
- Jung, I.D., Lee, J., Yun, S.Y., Park, C.G., Choi, W.S., Lee, H.W., Choi, O.H., Han, J.W., Lee, H.Y. (2002). Cdc42 and Rac1 are necessary for autotaxin-induced tumor cell motility in A2058 melanoma cells. *FEBS Lett* 532 (3): 351-6.
- Kallio, P.J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J., Poellinger, L. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (11): 5667-72.
- Kallio, P.J., Wilson, W.J., O'Brien, S., Makino, Y., Poellinger, L. (1999). Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 $\alpha$  by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 274 (10): 6519-25.
- Kamura, T., Maenaka, K., Kotoshiba, S., Matsumoto, M., Kohda, D., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Nakayama, K.I. (2004). VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Dev* 18 (24): 3055-65.
- Kamura, T., Sato, S., Iwai, K., Czyzyk-Krzeska, M., Conaway, R.C., Conaway, J.W. (2000). Activation of HIF1 $\alpha$  ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (19): 10430-5.
- Karchner, S.I., Franks, D.G., Powell, W.H., Hahn, M.E. (2002). Regulatory interactions among three members of the vertebrate aryl hydrocarbon receptor family: AHR repressor, AHR1, and AHR2. *J Biol Chem* 277 (9): 6949-59.
- Katschinski, D.M., Le, L., Schindler, S.G., Thomas, T., Voss, A.K., Wenger, R.H. (2004). Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  stabilization. *Cell Physiol Biochem* 14 (4-6): 351-60.
- Katzenellenbogen, B.S., Kendra, K.L., Norman, M.J., Berthois, Y. (1987). Proliferation, hormonal responsiveness, and estrogen receptor content of MCF-7 human breast cancer cells grown in the short-term and long-term absence of estrogens. *Cancer Res* 47 (16): 4355-60.

- Kawagoe, H., Stracke, M.L., Nakamura, H., Sano, K. (1997). Expression and transcriptional regulation of the PD- $\alpha$ /autotaxin gene in neuroblastoma. *Cancer Res* 57 (12): 2516-21.
- Kazlauskas, A., Poellinger, L., Pongratz, I. (1999). Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem* 274 (19): 13519-24.
- Ke, Q., Costa, M. (2006). Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 70 (5): 1469-80.
- Kehlen, A., Englert, N., Seifert, A., Klonisch, T., Dralle, H., Langner, J., Hoang-Vu, C. (2004). Expression, regulation and function of autotaxin in thyroid carcinomas. *Int J Cancer* 109 (6): 833-8.
- Kelling, C.K., Christian, B.J., Inhorn, S.L., Peterson, R.E. (1985). Hypophagia-induced weight loss in mice, rats, and guinea pigs treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundam Appl Toxicol* 5 (4): 700-12.
- Kerkvliet, N.I., Shepherd, D.M., Baecher-Steppan, L. (2002). T lymphocytes are direct, aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependent targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): AhR expression in both CD4+ and CD8+ T cells is necessary for full suppression of a cytotoxic T lymphocyte response by TCDD. *Toxicol Appl Pharmacol* 185 (2): 146-52.
- Kewley, R.J., Whitelaw, M.L., Chapman-Smith, A. (2004). The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* 36 (2): 189-204.
- Khurana, A., Nakayama, K., Williams, S., Davis, R.J., Mustelin, T., Ronai, Z.A. (2006). Regulation of the ring finger E3 ligase SIAH2 by p38 MAPK. *J Biol Chem*.
- Kibel, A., Iliopoulos, O., DeCaprio, J.A., Kaelin, W.G., Jr. (1995). Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science* 269 (5229): 1444-6.
- Kim, J.E., Sheen, Y.Y. (2000a). Inhibition of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-stimulated Cyp1a1 promoter activity by hypoxic agents. *Biochem Pharmacol* 59 (12): 1549-56.
- Kim, J.E., Sheen, Y.Y. (2000b). Nitric oxide inhibits dioxin action for the stimulation of Cyp1a1 promoter activity. *Biol Pharm Bull* 23 (5): 575-80.
- Kim, K.S., Rajagopal, V., Gonsalves, C., Johnson, C., Kalra, V.K. (2006). A novel role of hypoxia-inducible factor in cobalt chloride- and hypoxia-mediated expression of IL-8 chemokine in human endothelial cells. *J Immunol* 177 (10): 7211-24.
- King, A., Selak, M.A., Gottlieb, E. (2006). Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene* 25 (34): 4675-82.
- Kinoshita, K., Kikuchi, Y., Sasakura, Y., Suzuki, M., Fujii-Kuriyama, Y., Sogawa, K. (2004). Altered DNA binding specificity of Arnt by selection of partner bHLH-PAS proteins. *Nucleic Acids Res* 32 (10): 3169-79.
- Knowles, B.B., Howe, C.C., Aden, D.P. (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209 (4455): 497-9.
- Kobayashi, A., Numayama-Tsuruta, K., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y. (1997). CBP/p300 functions as a possible transcriptional coactivator of Ah receptor nuclear translocator (Arnt). *J Biochem (Tokyo)* 122 (4): 703-10.
- Koss, G. (2004). Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- Krishnan, V., Porter, W., Santostefano, M., Wang, X., Safe, S. (1995). Molecular mechanism of inhibition of estrogen-induced cathepsin D gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in MCF-7 cells. *Mol Cell Biol* 15 (12): 6710-9.
- Lacey, J.V., Jr., Devesa, S.S., Brinton, L.A. (2002). Recent trends in breast cancer incidence and mortality. *Environ Mol Mutagen* 39 (2-3): 82-8.
- Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L., Bruick, R.K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 16 (12): 1466-71.
- Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P.C., Semenza, G.L. (2001). HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 21 (12): 3995-4004.
- Lee, C., Kim, S.J., Jeong, D.G., Lee, S.M., Ryu, S.E. (2003). Structure of human FIH-1 reveals a unique active site pocket and interaction sites for HIF-1 and von Hippel-Lindau. *J Biol Chem* 278 (9): 7558-63.
- Lee, E., Yim, S., Lee, S.K., Park, H. (2002). Two transactivation domains of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  regulated by the MEK-1/p42/p44 MAPK pathway. *Mol Cells* 14 (1): 9-15.
- Lee, J.W., Bae, S.H., Jeong, J.W., Kim, S.H., Kim, K.W. (2004). Hypoxia-inducible factor (HIF-1) $\alpha$ : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 36 (1): 1-12.
- Lee, K., Burgoon, L.D., Lamb, L., Dere, E., Zacharewski, T.R., Hogenesch, J.B., Lapres, J.J. (2006). Identification and Characterization of Genes Susceptible to Transcriptional Cross-Talk between the Hypoxia and Dioxin Signaling Cascades. *Chem Res Toxicol* 19 (10): 1284-93.
- Lieb, M.E., Menzies, K., Moschella, M.C., Ni, R., Taubman, M.B. (2002). Mammalian EGLN genes have distinct patterns of mRNA expression and regulation. *Biochem Cell Biol* 80 (4): 421-6.

- Likhite, V.S., Stossi, F., Kim, K., Katzenellenbogen, B.S., Katzenellenbogen, J.A. (2006). Kinase-Specific Phosphorylation of the Estrogen Receptor Changes Receptor Interactions with Ligand, DNA, and Coregulators Associated with Alterations in Estrogen and Tamoxifen Activity. *Mol Endocrinol*.
- Liu, G., Schwartz, J.A., Brooks, S.C. (2000). Estrogen receptor protects p53 from deactivation by human double minute-2. *Cancer Res* 60 (7): 1810-4.
- Liu, L., Simon, M.C. (2004). Regulation of transcription and translation by hypoxia. *Cancer Biol Ther* 3 (6): 492-7.
- Liu, Y.V., Baek, J.H., Zhang, H., Diez, R., Cole, R.N., Semenza, G.L. (2007a). RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Mol Cell* 25 (2): 207-17.
- Liu, Y.V., Semenza, G.L. (2007b). RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 alpha degradation vs. stabilization. *Cell Cycle* 6 (6): 656-9.
- Loewy, Z.G., Leary, S.L., Baum, H.J. (1989). Site-directed transcription initiation with a mobile promoter. *Gene* 83 (2): 367-70.
- Lok, C.N., Ponka, P. (1999). Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem* 274 (34): 24147-52.
- Lu, H., Dalgard, C.L., Mohyeldin, A., McFate, T., Tait, A.S., Verma, A. (2005). Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1. *J Biol Chem* 280 (51): 41928-39.
- Lynch, J., Guo, L., Gelebart, P., Chilibeck, K., Xu, J., Molkentin, J.D., Agellon, L.B., Michalak, M. (2005). Calreticulin signals upstream of calcineurin and MEF2C in a critical Ca(2+)-dependent signaling cascade. *J Cell Biol* 170 (1): 37-47.
- Lynch, K.R. (2002). Lysophospholipid receptor nomenclature. *Biochim Biophys Acta* 1582 (1-3): 70-1.
- Ma, Q., Baldwin, K.T. (2002). A cycloheximide-sensitive factor regulates TCDD-induced degradation of the aryl hydrocarbon receptor. *Chemosphere* 46 (9-10): 1491-500.
- Ma, Q., Whitlock, J.P., Jr. (1997). A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem* 272 (14): 8878-84.
- Mabjeesh, N.J., Post, D.E., Willard, M.T., Kaur, B., Van Meir, E.G., Simons, J.W., Zhong, H. (2002). Geldanamycin induces degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha protein via the proteasome pathway in prostate cancer cells. *Cancer Res* 62 (9): 2478-82.
- Mabjeesh, N.J., Willard, M.T., Frederickson, C.E., Zhong, H., Simons, J.W. (2003). Androgens stimulate hypoxia-inducible factor 1 activation via autocrine loop of tyrosine kinase receptor/phosphatidylinositol 3'-kinase/protein kinase B in prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 9 (7): 2416-25.
- Mably, T.A., Bjerke, D.L., Moore, R.W., Gendron-Fitzpatrick, A., Peterson, R.E. (1992a). In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicol Appl Pharmacol* 114 (1): 118-26.
- Mably, T.A., Moore, R.W., Goy, R.W., Peterson, R.E. (1992b). In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 2. Effects on sexual behavior and the regulation of luteinizing hormone secretion in adulthood. *Toxicol Appl Pharmacol* 114 (1): 108-17.
- Madden, S.L., Galella, E.A., Riley, D., Bertelsen, A.H., Beaudry, G.A. (1996). Induction of cell growth regulatory genes by p53. *Cancer Res* 56 (23): 5384-90.
- Mandal, P.K. (2005). Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J Comp Physiol [B]* 175 (4): 221-30.
- Mandl, M., Slack, D.N., Keyse, S.M. (2005). Specific inactivation and nuclear anchoring of extracellular signal-regulated kinase 2 by the inducible dual-specificity protein phosphatase DUSP5. *Mol Cell Biol* 25 (5): 1830-45.
- Manka, D., Spicer, Z., Millhorn, D.E. (2005). Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein-3 knockdown enables growth of breast cancer metastases in the lung, liver, and bone. *Cancer Res* 65 (24): 11689-93.
- Marlowe, J.L., Knudsen, E.S., Schwemberger, S., Puga, A. (2004). The aryl hydrocarbon receptor displaces p300 from E2F-dependent promoters and represses S phase-specific gene expression. *J Biol Chem* 279 (28): 29013-22.
- Martin, F., Linden, T., Katschinski, D.M., Oehme, F., Flamme, I., Mukhopadhyay, C.K., Eckhardt, K., Troger, J., Barth, S., Camenisch, G., Wenger, R.H. (2005). Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation. *Blood* 105 (12): 4613-9.
- Martinez, J.M., Afshari, C.A., Bushel, P.R., Masuda, A., Takahashi, T., Walker, N.J. (2002). Differential toxicogenomic responses to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in malignant and nonmalignant human airway epithelial cells. *Toxicol Sci* 69 (2): 409-23.

- Marxsen, J.H., Stengel, P., Doege, K., Heikkinen, P., Jokilehto, T., Wagner, T., Jelkmann, W., Jaakkola, P., Metzen, E. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF- $\alpha$ -prolyl-4-hydroxylases. *Biochem J* 381 (Pt 3): 761-7.
- Matthews, J., Almlöf, T., Kietz, S., Leers, J., Gustafsson, J.A. (2005). Estrogen receptor- $\alpha$  regulates SOCS-3 expression in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 335 (1): 168-74.
- Matthews, J., Gustafsson, J.A. (2006). Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl Recept Signal* 4: e016.
- McCaffrey, P.G., Perrino, B.A., Soderling, T.R., Rao, A. (1993). NF-ATp, a T lymphocyte DNA-binding protein that is a target for calcineurin and immunosuppressive drugs. *J Biol Chem* 268 (5): 3747-52.
- McCahill, A., Warwicker, J., Bolger, G.B., Houslay, M.D., Yarwood, S.J. (2002). The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms. *Mol Pharmacol* 62 (6): 1261-73.
- McConnell, E.E., Moore, J.A., Haseman, J.K., Harris, M.W. (1978). The comparative toxicity of chlorinated dibenzo-p-dioxins in mice and guinea pigs. *Toxicol Appl Pharmacol* 44 (2): 335-56.
- McDonough, M.A., Li, V., Flashman, E., Chowdhury, R., Mohr, C., Lienard, B.M., Zondlo, J., Oldham, N.J., Clifton, I.J., Lewis, J., McNeill, L.A., Kurzeja, R.J., Hewitson, K.S., Yang, E., Jordan, S., Syed, R.S., Schofield, C.J. (2006). Cellular oxygen sensing: Crystal structure of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase (PHD2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (26): 9814-9.
- McGuire, J., Whitelaw, M.L., Pongratz, I., Gustafsson, J.A., Poellinger, L. (1994). A cellular factor stimulates ligand-dependent release of hsp90 from the basic helix-loop-helix dioxin receptor. *Mol Cell Biol* 14 (4): 2438-46.
- McHale, C.M., Zhang, L., Hubbard, A.E., Zhao, X., Baccarelli, A., Pesatori, A.C., Smith, M.T., Landi, M.T. (2007). Microarray analysis of gene expression in peripheral blood mononuclear cells from dioxin-exposed human subjects. *Toxicology* 229 (1-2): 101-13.
- McManus, M.T., Sharp, P.A. (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 3 (10): 737-47.
- McNeill, L.A., Hewitson, K.S., Claridge, T.D., Seibel, J.F., Horsfall, L.E., Schofield, C.J. (2002). Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the beta-carbon of asparagine-803. *Biochem J* 367 (Pt 3): 571-5.
- McPherson, K., Steel, C.M., Dixon, J.M. (2000). ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *Bmj* 321 (7261): 624-8.
- Metzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J.H., Stolze, I., Klinger, M., Huang, W.Q., Wotzlaw, C., Hellwig-Burgel, T., Jelkmann, W., Acker, H., Fandrey, J. (2003). Intracellular localisation of human HIF-1  $\alpha$  hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* 116 (Pt 7): 1319-26.
- Metzen, E., Stiehl, D.P., Doege, K., Marxsen, J.H., Hellwig-Burgel, T., Jelkmann, W. (2005). Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (phd2/egln-1) gene: identification of a functional hypoxia-responsive element. *Biochem J* 387 (Pt 3): 711-7.
- Meyer, B.K., Perdew, G.H. (1999). Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 core complex and the role of the immunophilin-related protein XAP2 in AhR stabilization. *Biochemistry* 38 (28): 8907-17.
- Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev* 13 (1): 20-5.
- Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y. (2003). Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* 1619 (3): 263-8.
- Min, J.H., Yang, H., Ivan, M., Gertler, F., Kaelin, W.G., Jr., Pavletich, N.P. (2002). Structure of an HIF-1 $\alpha$ -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 296 (5574): 1886-9.
- Miniero, R., De Felip, E., Ferri, F., di Domenico, A. (2001). An overview of TCDD half-life in mammals and its correlation to body weight. *Chemosphere* 43 (4-7): 839-44.
- Mizukami, Y., Fujiki, K., Duerr, E.M., Gala, M., Jo, W.S., Zhang, X., Chung, D.C. (2006). Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor through the induction of phosphatidylinositol 3-kinase/Rho/ROCK and c-Myc. *J Biol Chem* 281 (20): 13957-63.
- Murata, J., Lee, H.Y., Clair, T., Krutzsch, H.C., Arestad, A.A., Sobel, M.E., Liotta, L.A., Stracke, M.L. (1994). cDNA cloning of the human tumor motility-stimulating protein, autotaxin, reveals a homology with phosphodiesterases. *J Biol Chem* 269 (48): 30479-84.
- Nakayama, K., Ronai, Z. (2004). Siah: new players in the cellular response to hypoxia. *Cell Cycle* 3 (11): 1345-7.
- Neckers, L., Ivy, S.P. (2003). Heat shock protein 90. *Curr Opin Oncol* 15 (6): 419-24.
- Nestler, D., Risch, M., Fischer, B., Pocar, P. (2007). Regulation of aryl hydrocarbon receptor activity in porcine cumulus-oocyte complexes in physiological and toxicological conditions: the role of follicular fluid. *Reproduction* 133 (5): 887-97.
- Nie, M., Blankenship, A.L., Giesy, J.P. (2001). Interactions between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and hypoxia signaling pathways. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10 (1-2): 17-27.

- Northrop, J.P., Ho, S.N., Chen, L., Thomas, D.J., Timmerman, L.A., Nolan, G.P., Admon, A., Crabtree, G.R. (1994). NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature* 369 (6480): 497-502.
- Obach, M., Navarro-Sabate, A., Caro, J., Kong, X., Duran, J., Gomez, M., Perales, J.C., Ventura, F., Rosa, J.L., Bartrons, R. (2004). 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J Biol Chem* 279 (51): 53562-70.
- Ohh, M., Park, C.W., Ivan, M., Hoffman, M.A., Kim, T.Y., Huang, L.E., Pavletich, N., Chau, V., Kaelin, W.G. (2000). Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* 2 (7): 423-7.
- Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S. (2003). Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423 (6939): 545-50.
- O'Keefe, S.J., Tamura, J., Kincaid, R.L., Tocci, M.J., O'Neill, E.A. (1992). FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* 357 (6380): 692-4.
- Olson, J.R., Holscher, M.A., Neal, R.A. (1980). Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the golden Syrian hamster. *Toxicol Appl Pharmacol* 55 (1): 67-78.
- Osada, M., Imaoka, S., Funae, Y. (2004). Apigenin suppresses the expression of VEGF, an important factor for angiogenesis, in endothelial cells via degradation of HIF-1alpha protein. *FEBS Lett* 575 (1-3): 59-63.
- Paajarvi, G., Viluksela, M., Pohjanvirta, R., Stenius, U., Hogberg, J. (2005). TCDD activates Mdm2 and attenuates the p53 response to DNA damaging agents. *Carcinogenesis* 26 (1): 201-8.
- Paddenberg, R., Goldenberg, A., Faulhammer, P., Braun-Dullaeus, R.C., Kummer, W. (2003). Mitochondrial complex II is essential for hypoxia-induced ROS generation and vasoconstriction in the pulmonary vasculature. *Adv Exp Med Biol* 536: 163-9.
- Palmer, J.R., Wise, L.A., Hatch, E.E., Troisi, R., Titus-Ernstoff, L., Strohsnitter, W., Kaufman, R., Herbst, A.L., Noller, K.L., Hyer, M., Hoover, R.N. (2006). Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15 (8): 1509-14.
- Paltoglou, S., Roberts, B.J. (2006). HIF-1alpha and EPAS ubiquitination mediated by the VHL tumour suppressor involves flexibility in the ubiquitination mechanism, similar to other RING E3 ligases. *Oncogene*.
- Pan, Y., Mansfield, K.D., Bertozzi, C.C., Rudenko, V., Chan, D.A., Giaccia, A.J., Simon, M.C. (2007). Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 27 (3): 912-25.
- Park, H. (1999). Aromatic hydrocarbon nuclear translocator as a common component for the hypoxia- and dioxin-induced gene expression. *Mol Cells* 9 (2): 172-8.
- Parker, B.A., Stark, G.R. (1979). Regulation of simian virus 40 transcription: sensitive analysis of the RNA species present early in infections by virus or viral DNA. *J Virol* 31 (2): 360-9.
- Parzefall, W. (2002). Risk assessment of dioxin contamination in human food. *Food Chem Toxicol* 40 (8): 1185-9.
- Paulson, K.E., Darnell, J.E., Jr., Rushmore, T., Pickett, C.B. (1990). Analysis of the upstream elements of the xenobiotic compound-inducible and positionally regulated glutathione S-transferase Ya gene. *Mol Cell Biol* 10 (5): 1841-52.
- Pearce, S.T., Jordan, V.C. (2004). The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 50 (1): 3-22.
- Pearl, L.H., Prodromou, C. (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem* 75: 271-94.
- Pescador, N., Cuevas, Y., Naranjo, S., Alcaide, M., Villar, D., Landazuri, M.O., Del Peso, L. (2005). Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (eglN3/phd3) gene. *Biochem J* 390 (Pt 1): 189-97.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29 (9): e45.
- Phelan, D., Winter, G.M., Rogers, W.J., Lam, J.C., Denison, M.S. (1998). Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin. *Arch Biochem Biophys* 357 (1): 155-63.
- Phelps, M., Phillips, A., Darley, M., Blaydes, J.P. (2005). MEK-ERK signaling controls Hdm2 oncoprotein expression by regulating hdm2 mRNA export to the cytoplasm. *J Biol Chem* 280 (17): 16651-8.
- Pickart, C.M. (1997). Targeting of substrates to the 26S proteasome. *Faseb J* 11 (13): 1055-66.
- Pickart, C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70: 503-33.
- Pickart, C.M., Eddins, M.J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695 (1-3): 55-72.
- Pink, J.J., Jordan, V.C. (1996). Models of estrogen receptor regulation by estrogens and antiestrogens in breast cancer cell lines. *Cancer Res* 56 (10): 2321-30.

- Pinkas, J., Naber, S.P., Butel, J.S., Medina, D., Jerry, D.J. (1999). Expression of MDM2 during mammary tumorigenesis. *Int J Cancer* 81 (2): 292-8.
- Pocar, P., Augustin, R., Fischer, B. (2004). Constitutive expression of CYP1A1 in bovine cumulus oocyte-complexes in vitro: mechanisms and biological implications. *Endocrinology* 145 (4): 1594-601.
- Pocar, P., Fischer, B., Klonisch, T., Hombach-Klonisch, S. (2005). Molecular interactions of the aryl hydrocarbon receptor and its biological and toxicological relevance for reproduction. *Reproduction* 129 (4): 379-89.
- Pohjanvirta, R., Viluksela, M., Tuomisto, J.T., Unkila, M., Karasinska, J., Franc, M.A., Holowenko, M., Giannone, J.V., Harper, P.A., Tuomisto, J., Okey, A.B. (1999). Physicochemical differences in the AH receptors of the most TCDD-susceptible and the most TCDD-resistant rat strains. *Toxicol Appl Pharmacol* 155 (1): 82-95.
- Poland, A., Knutson, J.C. (1982). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22: 517-54.
- Pollenz, R.S., Davarinos, N.A., Shearer, T.P. (1999). Analysis of aryl hydrocarbon receptor-mediated signaling during physiological hypoxia reveals lack of competition for the aryl hydrocarbon nuclear translocator transcription factor. *Mol Pharmacol* 56 (6): 1127-37.
- Pollock, P.L., Germolec, D.R., Comment, C.E., Rosenthal, G.J., Luster, M.I. (1994). Development of human lymphocyte-engrafted SCID mice as a model for immunotoxicity assessment. *Fundam Appl Toxicol* 22 (1): 130-8.
- Pongratz, I., Mason, G.G., Poellinger, L. (1992). Dual roles of the 90-kDa heat shock protein hsp90 in modulating functional activities of the dioxin receptor. Evidence that the dioxin receptor functionally belongs to a subclass of nuclear receptors which require hsp90 both for ligand binding activity and repression of intrinsic DNA binding activity. *J Biol Chem* 267 (19): 13728-34.
- Potter, C.L., Sipes, I.G., Russell, D.H. (1983). Hypothyroxinemia and hypothermia in rats in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 69 (1): 89-95.
- Pouyssegur, J., Dayan, F., Mazure, N.M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441 (7092): 437-43.
- Prasch, A.L., Andreasen, E.A., Peterson, R.E., Heideman, W. (2004). Interactions between 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and hypoxia signaling pathways in zebrafish: hypoxia decreases responses to TCDD in zebrafish embryos. *Toxicol Sci* 78 (1): 68-77.
- Puga, A., Hoffer, A., Zhou, S., Bohm, J.M., Leikauf, G.D., Shertzer, H.G. (1997). Sustained increase in intracellular free calcium and activation of cyclooxygenase-2 expression in mouse hepatoma cells treated with dioxin. *Biochem Pharmacol* 54 (12): 1287-96.
- Quintero, M., Brennan, P.A., Thomas, G.J., Moncada, S. (2006). Nitric oxide is a factor in the stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha in cancer: role of free radical formation. *Cancer Res* 66 (2): 770-4.
- Rao, A., Luo, C., Hogan, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15: 707-47.
- Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z.M., Sutter, C.H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L.E., Madan, A., Semenza, G.L., Bedi, A. (2000). Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 14 (1): 34-44.
- Ricci, M.S., Toscano, D.G., Mattingly, C.J., Toscano, W.A., Jr. (1999). Estrogen receptor reduces CYP1A1 induction in cultured human endometrial cells. *J Biol Chem* 274 (6): 3430-8.
- Richard, D.E., Berra, E., Gothie, E., Roux, D., Pouyssegur, J. (1999). p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* 274 (46): 32631-7.
- Ridgway, P.F., Ziprin, P., Alkhamisi, N., Paraskeva, P.A., Peck, D.H., Darzi, A.W. (2005). Hypoxia augments gelatinase activity in a variety of adenocarcinomas in vitro. *J Surg Res* 124 (2): 180-6.
- Roe, J.S., Kim, H., Lee, S.M., Kim, S.T., Cho, E.J., Youn, H.D. (2006a). p53 stabilization and transactivation by a von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell* 22 (3): 395-405.
- Roe, J.S., Youn, H.D. (2006b). The Positive Regulation of p53 by the Tumor Suppressor VHL. *Cell Cycle* 5 (18).
- Ron, D., Chen, C.H., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E., Mochly-Rosen, D. (1994). Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (3): 839-43.
- Ruas, J.L., Poellinger, L., Pereira, T. (2002). Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein. *J Biol Chem* 277 (41): 38723-30.
- Ruas, J.L., Poellinger, L., Pereira, T. (2005). Role of CBP in regulating HIF-1-mediated activation of transcription. *J Cell Sci* 118 (Pt 2): 301-11.

- Ruohola, J.K., Valve, E.M., Karkkainen, M.J., Joukov, V., Alitalo, K., Harkonen, P.L. (1999). Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 149 (1-2): 29-40.
- Rusnak, F., Mertz, P. (2000). Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 80 (4): 1483-521.
- Ryan, H.E., Lo, J., Johnson, R.S. (1998). HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J* 17 (11): 3005-15.
- Ryan, K.M., Phillips, A.C., Vousden, K.H. (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* 13 (3): 332-7.
- Safe, S., Wormke, M., Samudio, I. (2000). Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5 (3): 295-306.
- Safe, S.H. (1998). Development validation and problems with the toxic equivalency factor approach for risk assessment of dioxins and related compounds. *J Anim Sci* 76 (1): 134-41.
- Saji, S., Okumura, N., Eguchi, H., Nakashima, S., Suzuki, A., Toi, M., Nozawa, Y., Hayashi, S. (2001). MDM2 enhances the function of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 281 (1): 259-65.
- Sanchez-Tillo, E., Comalada, M., Xaus, J., Farrera, C., Valledor, A.F., Caelles, C., Lloberas, J., Celada, A. (2007). JNK1 is required for the induction of Mkp1 expression in macrophages during proliferation and lipopolysaccharide-dependent activation. *J Biol Chem* 282 (17): 12566-73.
- Sang, N., Stiehl, D.P., Bohensky, J., Leshchinsky, I., Srinivas, V., Caro, J. (2003). MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem* 278 (16): 14013-9.
- Sayeed, A., Konduri, S.D., Liu, W., Bansal, S., Li, F., Das, G.M. (2007). Estrogen receptor alpha inhibits p53-mediated transcriptional repression: implications for the regulation of apoptosis. *Cancer Res* 67 (16): 7746-55.
- Schaldach, C.M., Riby, J., Bjeldanes, L.F. (1999). Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry* 38 (23): 7594-600.
- Schmidt, J.V., Bradfield, C.A. (1996). Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 55-89.
- Schulte, K.M., Beyer, A., Kohrer, K., Oberhauser, S., Roher, H.D. (2001). Lysophosphatidic acid, a novel lipid growth factor for human thyroid cells: over-expression of the high-affinity receptor edg4 in differentiated thyroid cancer. *Int J Cancer* 92 (2): 249-56.
- Schuur, A.G., Boekhorst, F.M., Brouwer, A., Visser, T.J. (1997). Extrathyroidal effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on thyroid hormone turnover in male Sprague-Dawley rats. *Endocrinology* 138 (9): 3727-34.
- Seagroves, T.N., Ryan, H.E., Lu, H., Wouters, B.G., Knapp, M., Thibault, P., Laderoute, K., Johnson, R.S. (2001). Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 21 (10): 3436-44.
- Seifert, A., Katschinski, D.M., Tonack, S., Fischer, B., Navarrete Santos, A. (2007). Significance of Prolyl Hydroxylase 2 in the Interference of Aryl Hydrocarbon Receptor and Hypoxia-Inducible Factor-1alpha Signaling. *Chem Res Toxicol*.
- Sekine, Y., Ikeda, O., Hayakawa, Y., Tsuji, S., Imoto, S., Aoki, N., Sugiyama, K., Matsuda, T. (2007). DUSP22/LMW-DSP2 regulates estrogen receptor-alpha-mediated signaling through dephosphorylation of Ser-118. *Oncogene* 26 (41): 6038-49.
- Semenza, G.L. (2006). VHL and p53: tumor suppressors team up to prevent cancer. *Mol Cell* 22 (4): 437-9.
- Shiizaki, K., Ohsako, S., Koyama, T., Nagata, R., Yonemoto, J., Tohyama, C. (2005). Lack of CYP1A1 expression is involved in unresponsiveness of the human hepatoma cell line SK-HEP-1 to dioxin. *Toxicol Lett* 160 (1): 22-33.
- Shyu, K.G., Liou, J.Y., Wang, B.W., Fang, W.J., Chang, H. (2005). Carvedilol prevents cardiac hypertrophy and overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor in pressure-overloaded rat heart. *J Biomed Sci* 12 (2): 409-20.
- Slomiany, M.G., Rosenzweig, S.A. (2004). IGF-1-induced VEGF and IGFBP-3 secretion correlates with increased HIF-1 alpha expression and activity in retinal pigment epithelial cell line D407. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 (8): 2838-47.
- Song, Z., Pollenz, R.S. (2002). Ligand-dependent and independent modulation of aryl hydrocarbon receptor localization, degradation, and gene regulation. *Mol Pharmacol* 62 (4): 806-16.
- Song, Z., Pollenz, R.S. (2003). Functional analysis of murine aryl hydrocarbon (AH) receptors defective in nuclear import: impact on AH receptor degradation and gene regulation. *Mol Pharmacol* 63 (3): 597-606.

- Spink, D.C., Eugster, H.P., Lincoln, D.W., 2nd, Schuetz, J.D., Schuetz, E.G., Johnson, J.A., Kaminsky, L.S., Gierthy, J.F. (1992). 17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1A1: a comparison of the activities induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in MCF-7 cells with those from heterologous expression of the cDNA. *Arch Biochem Biophys* 293 (2): 342-8.
- Spink, D.C., Johnson, J.A., Connor, S.P., Aldous, K.M., Gierthy, J.F. (1994). Stimulation of 17 beta-estradiol metabolism in MCF-7 cells by bromochloro- and chloromethyl-substituted dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans: correlations with antiestrogenic activity. *J Toxicol Environ Health* 41 (4): 451-66.
- Spink, D.C., Lincoln, D.W., 2nd, Dickerman, H.W., Gierthy, J.F. (1990). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes an extensive alteration of 17 beta-estradiol metabolism in MCF-7 breast tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (17): 6917-21.
- Stebbins, C.E., Kaelin, W.G., Jr., Pavletich, N.P. (1999). Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* 284 (5413): 455-61.
- Steele, M.R., McCahill, A., Thompson, D.S., MacKenzie, C., Isaacs, N.W., Houslay, M.D., Bolger, G.B. (2001). Identification of a surface on the beta-propeller protein RACK1 that interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5. *Cell Signal* 13 (7): 507-13.
- Steenland, K., Bertazzi, P., Baccarelli, A., Kogevinas, M. (2004). Dioxin revisited: developments since the 1997 IARC classification of dioxin as a human carcinogen. *Environ Health Perspect* 112 (13): 1265-8.
- Stiehl, D.P., Jelkmann, W., Wenger, R.H., Hellwig-Burgel, T. (2002). Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett* 512 (1-3): 157-62.
- Stiehl, D.P., Wirthner, R., Koditz, J., Spielmann, P., Camenisch, G., Wenger, R.H. (2006). Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels. Evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. *J Biol Chem* 281 (33): 23482-91.
- Stracke, M.L., Krutzsch, H.C., Unsworth, E.J., Arestad, A., Cioce, V., Schiffmann, E., Liotta, L.A. (1992). Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem* 267 (4): 2524-9.
- Sugimoto, T., Stewart, S., Guan, K.L. (1997). The calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin is the major Elk-1 phosphatase. *J Biol Chem* 272 (47): 29415-8.
- Sulentic, C.E., Holsapple, M.P., Kaminski, N.E. (2000). Putative link between transcriptional regulation of IgM expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and the aryl hydrocarbon receptor/dioxin-responsive enhancer signaling pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 295 (2): 705-16.
- Sulentic, C.E., Kang, J.S., Na, Y.J., Kaminski, N.E. (2004). Interactions at a dioxin responsive element (DRE) and an overlapping kappaB site within the hs4 domain of the 3'alpha immunoglobulin heavy chain enhancer. *Toxicology* 200 (2-3): 235-46.
- Swanson, H.I., Chan, W.K., Bradfield, C.A. (1995). DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J Biol Chem* 270 (44): 26292-302.
- Swarthout, J.T., Walling, H.W. (2000). Lysophosphatidic acid: receptors, signaling and survival. *Cell Mol Life Sci* 57 (13-14): 1978-85.
- Swillens, S., Goffard, J.C., Marechal, Y., de Kerchove d'Exaerde, A., El Housni, H. (2004). Instant evaluation of the absolute initial number of cDNA copies from a single real-time PCR curve. *Nucleic Acids Res* 32 (6): e56.
- Tacchini, L., Dansi, P., Matteucci, E., Desiderio, M.A. (2001). Hepatocyte growth factor signalling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells. *Carcinogenesis* 22 (9): 1363-71.
- Taniyama, Y., Ito, M., Sato, K., Kuester, C., Veit, K., Tremp, G., Liao, R., Colucci, W.S., Ivashchenko, Y., Walsh, K., Shiojima, I. (2005). Akt3 overexpression in the heart results in progression from adaptive to maladaptive hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 38 (2): 375-85.
- Thomas, K.A. (1996). Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 271 (2): 603-6.
- Thomsen, J.S., Kietz, S., Strom, A., Gustafsson, J.A. (2004). HES-1, a novel target gene for the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol* 65 (1): 165-71.
- Thornton, C., Tang, K.C., Phamluong, K., Luong, K., Vagts, A., Nikanjam, D., Yaka, R., Ron, D. (2004). Spatial and temporal regulation of RACK1 function and N-methyl-D-aspartate receptor activity through WD40 motif-mediated dimerization. *J Biol Chem* 279 (30): 31357-64.
- Thurmond, T.S., Gasiewicz, T.A. (2000). A single dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin produces a time- and dose-dependent alteration in the murine bone marrow B-lymphocyte maturation profile. *Toxicol Sci* 58 (1): 88-95.
- Tian, Y.M., Mole, D.R., Ratcliffe, P.J., Gleadle, J.M. (2006). Characterization of different isoforms of the HIF prolyl hydroxylase PHD1 generated by alternative initiation. *Biochem J* 397 (1): 179-86.
- Tjernberg, A., Markova, N., Griffiths, W.J., Hallen, D. (2006). DMSO-related effects in protein characterization. *J Biomol Screen* 11 (2): 131-7.

- Toescu, E.C. (2004). Hypoxia response elements. *Cell Calcium* 36 (3-4): 181-5.
- Tokumura, A., Majima, E., Kariya, Y., Tominaga, K., Kogure, K., Yasuda, K., Fukuzawa, K. (2002). Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J Biol Chem* 277 (42): 39436-42.
- Tomita, S., Sinal, C.J., Yim, S.H., Gonzalez, F.J. (2000). Conditional disruption of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) gene leads to loss of target gene induction by the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Endocrinol* 14 (10): 1674-81.
- Tonack, S., Kind, K., Thompson, J.G., Wobus, A.M., Fischer, B., Santos, A.N. (2007). Dioxin affects glucose transport via the arylhydrocarbon receptor signal cascade in pluripotent embryonic carcinoma cells. *Endocrinology*.
- Trisciuglio, D., Iervolino, A., Candiloro, A., Fibbi, G., Fanciulli, M., Zangemeister-Wittke, U., Zupi, G., Del Bufalo, D. (2004). bcl-2 induction of urokinase plasminogen activator receptor expression in human cancer cells through Sp1 activation: involvement of ERK1/ERK2 activity. *J Biol Chem* 279 (8): 6737-45.
- Tsuchiya, Y., Nakajima, M., Itoh, S., Iwanari, M., Yokoi, T. (2003). Expression of aryl hydrocarbon receptor repressor in normal human tissues and inducibility by polycyclic aromatic hydrocarbons in human tumor-derived cell lines. *Toxicol Sci* 72 (2): 253-9.
- Tuschl, T. (2001). RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem* 2 (4): 239-45.
- Tuschl, T., Borkhardt, A. (2002). Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Mol Interv* 2 (3): 158-67.
- Ueda, K., Arakawa, H., Nakamura, Y. (2003). Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53. *Oncogene* 22 (36): 5586-91.
- Umezu-Goto, M., Kishi, Y., Taira, A., Hama, K., Dohmae, N., Takio, K., Yamori, T., Mills, G.B., Inoue, K., Aoki, J., Arai, H. (2002). Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol* 158 (2): 227-33.
- Unkila, M., Ruotsalainen, M., Pohjanvirta, R., Viluksela, M., MacDonald, E., Tuomisto, J.T., Rozman, K., Tuomisto, J. (1995). Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on tryptophan and glucose homeostasis in the most TCDD-susceptible and the most TCDD-resistant species, guinea pigs and hamsters. *Arch Toxicol* 69 (10): 677-83.
- van Leeuwen, F.X., Feeley, M., Schrenk, D., Larsen, J.C., Farland, W., Younes, M. (2000). Dioxins: WHO's tolerable daily intake (TDI) revisited. *Chemosphere* 40 (9-11): 1095-101.
- Vaupel, P., Briest, S., Hockel, M. (2002). Hypoxia in breast cancer: pathogenesis, characterization and biological/therapeutic implications. *Wien Med Wochenschr* 152 (13-14): 334-42.
- Vaupel, P., Kelleher, D.K., Thews, O. (1998). Modulation of tumor oxygenation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42 (4): 843-8.
- Verger, P., Cordier, S., Thuy, L.T., Bard, D., Dai, L.C., Phiet, P.H., Gonnord, M.F., Abenhaim, L. (1994). Correlation between dioxin levels in adipose tissue and estimated exposure to Agent Orange in south Vietnamese residents. *Environ Res* 65 (2): 226-42.
- Vineis, P. (1996). Incidence and time trends for lymphomas, leukemias and myelomas: hypothesis generation. Working Group on the Epidemiology of Hematolymphopoietic Malignancies in Italy. *Leuk Res* 20 (4): 285-90.
- Vogel, C.F., Matsumura, F. (2003). Interaction of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) with induced adipocyte differentiation in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) involves tyrosine kinase c-Src. *Biochem Pharmacol* 66 (7): 1231-44.
- Vos, J.G., De Heer, C., Van Loveren, H. (1997). Immunotoxic effects of TCDD and toxic equivalency factors. *Teratog Carcinog Mutagen* 17 (4-5): 275-84.
- Vos, J.G., Moore, J.A. (1974). Suppression of cellular immunity in rats and mice by maternal treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 47 (5): 777-94.
- Walsh, C.T., Zydowsky, L.D., McKeon, F.D. (1992). Cyclosporin A, the cyclophilin class of peptidylprolyl isomerases, and blockade of T cell signal transduction. *J Biol Chem*. 267: 13115-8.
- Wang, F., Samudio, I., Safe, S. (2001). Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol Cell Endocrinol* 172 (1-2): 91-103.
- Wang, X., Porter, W., Krishnan, V., Narasimhan, T.R., Safe, S. (1993). Mechanism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-mediated decrease of the nuclear estrogen receptor in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 96 (1-2): 159-66.
- Warner, M., Eskenazi, B., Mocarelli, P., Gerthoux, P.M., Samuels, S., Needham, L., Patterson, D., Brambilla, P. (2002). Serum dioxin concentrations and breast cancer risk in the Seveso Women's Health Study. *Environ Health Perspect* 110 (7): 625-8.
- Wartenberg, M., Schallenberg, M., Hescheler, J., Sauer, H. (2003). Reactive oxygen species-mediated regulation of eNOS and iNOS expression in multicellular prostate tumor spheroids. *Int J Cancer* 104 (3): 274-82.

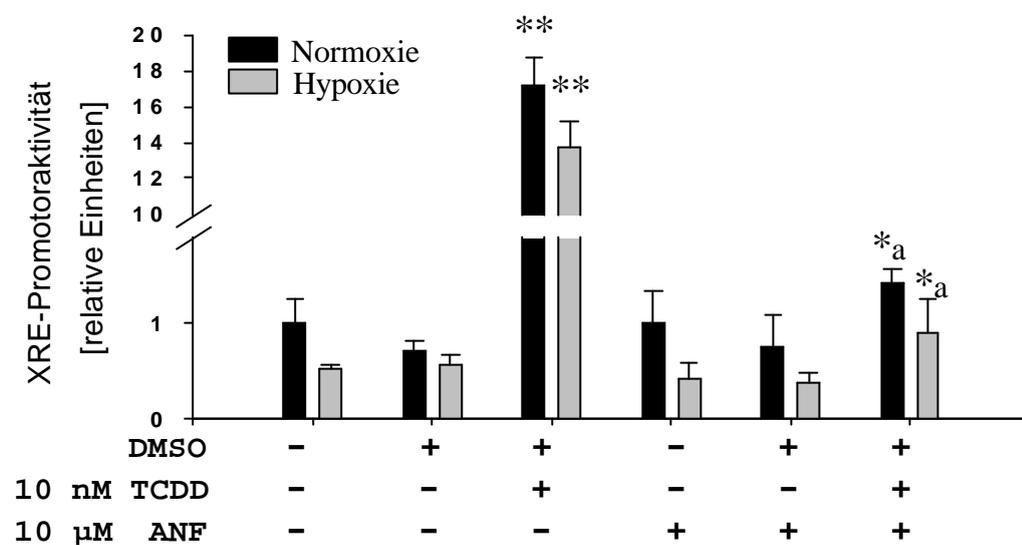
- Watts, S.W. (1996). Serotonin activates the mitogen-activated protein kinase pathway in vascular smooth muscle: use of the mitogen-activated protein kinase inhibitor PD098059. *J Pharmacol Exp Ther* 279 (3): 1541-50.
- Wei, C.L., Wu, Q., Vega, V.B., Chiu, K.P., Ng, P., Zhang, T., Shahab, A., Yong, H.C., Fu, Y., Weng, Z., Liu, J., Zhao, X.D., Chew, J.L., Lee, Y.L., Kuznetsov, V.A., Sung, W.K., Miller, L.D., Lim, B., Liu, E.T., Yu, Q., Ng, H.H., Ruan, Y. (2006). A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* 124 (1): 207-19.
- Wenger, R.H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *Faseb J* 16 (10): 1151-62.
- Whitelaw, M.L., Gottlicher, M., Gustafsson, J.A., 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 (11): 4169-79.
- Whitelaw, M.L., Gustafsson, J.A., 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 (12): 8343-55.
- Whitesell, L., Lindquist, S.L. (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 5 (10): 761-72.
- Wilkins, B.J., Dai, Y.S., Bueno, O.F., Parsons, S.A., Xu, J., Plank, D.M., Jones, F., Kimball, T.R., Molkenin, J.D. (2004). Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res* 94 (1): 110-8.
- Wormke, M., Stoner, M., Saville, B., Walker, K., Abdelrahim, M., Burghardt, R., Safe, S. (2003). The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes. *Mol Cell Biol* 23 (6): 1843-55.
- Wu, G.S. (2004). The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 3 (2): 156-61.
- Wu, J., Jin, Y.J., Calaf, G.M., Huang, W.L., Yin, Y. (2007). PAC1 is a direct transcription target of E2F-1 in apoptotic signaling. *Oncogene* 26 (45): 6526-35.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D., Levine, A.J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7 (7A): 1126-32.
- Yang, S.Y., Lee, J., Park, C.G., Kim, S., Hong, S., Chung, H.C., Min, S.K., Han, J.W., Lee, H.W., Lee, H.Y. (2002). Expression of autotaxin (NPP-2) is closely linked to invasiveness of breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 19 (7): 603-8.
- Yang, Y., Mou, L., Liu, N., Tsao, M.S. (1999). Autotaxin expression in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21 (2): 216-22.
- Yechor, V.K., Patti, M.E., Ueki, K., Laustsen, P.G., Saccone, R., Rauniyar, R., Kahn, C.R. (2004). Distinct pathways of insulin-regulated versus diabetes-regulated gene expression: an in vivo analysis in MIRKO mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (47): 16525-30.
- Yiu, G.K., Toker, A. (2006). NFAT induces breast cancer cell invasion by promoting the induction of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 281 (18): 12210-7.
- Yueh, M.F., Huang, Y.H., Hiller, A., Chen, S., Nguyen, N., Tukey, R.H. (2003). Involvement of the xenobiotic response element (XRE) in Ah receptor-mediated induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1. *J Biol Chem* 278 (17): 15001-6.
- Zeiger, M., Haag, R., Hockel, J., Schrenk, D., Schmitz, H.J. (2001). Inducing effects of dioxin-like polychlorinated biphenyls on CYP1A in the human hepatoblastoma cell line HepG2, the rat hepatoma cell line H4IIE, and rat primary hepatocytes: comparison of relative potencies. *Toxicol Sci* 63 (1): 65-73.
- Zhao, Z., Xu, S., Zhang, G. (1999). [A study on expression of autotaxin mRNA in hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 7 (3): 140-1.
- Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M.M., Simons, J.W., Semenza, G.L. (2000). Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 60 (6): 1541-5.
- Zhong, H., De Marzo, A.M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D.A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W.B., Semenza, G.L., Simons, J.W. (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 59 (22): 5830-5.
- Zhou, J., Schmid, T., Frank, R., Brune, B. (2004). PI3K/Akt is required for heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor 1alpha from pVHL-independent degradation. *J Biol Chem* 279 (14): 13506-13.
- Zhou, J., Schmid, T., Schnitzer, S., Brune, B. (2006). Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer Lett* 237 (1): 10-21.

## 7 Anhang A

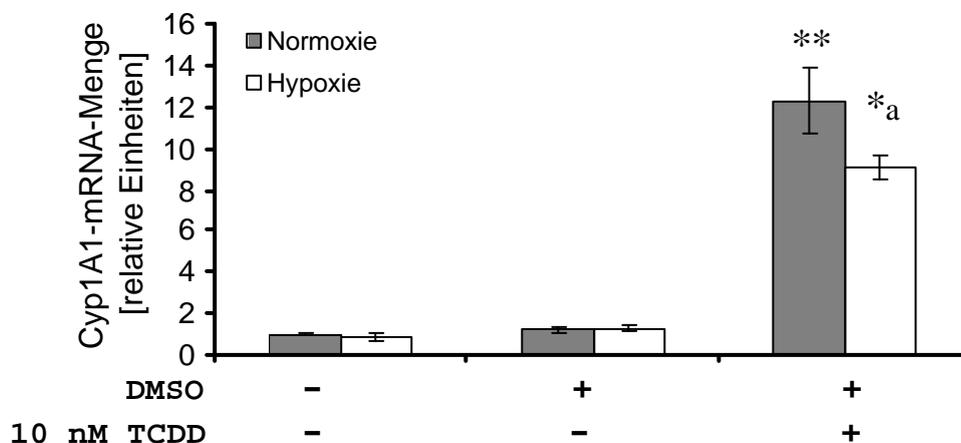
### 7.1 Weitere Versuchsergebnisse (Verweise im Abschnitt 3. enthalten)

#### 7.1.1 Daten zum Abschnitt „Aktivierung des AhR-Signalweges nach Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie“

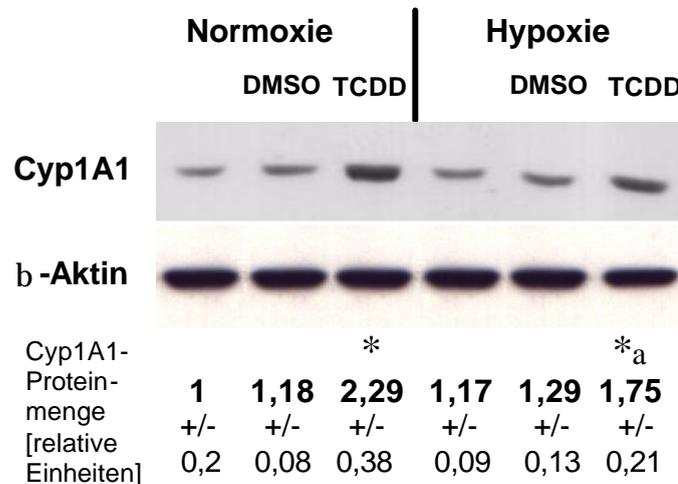
- A) XRE-Promotoraktivität in HepG2-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. Die Aktivität der *Firefly*-Luziferase wurde durch die *Renilla*-Luziferase-Aktivität normalisiert. (\*  $p < 0,05$  oder \*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a  $p < 0,05$  im Vergleich zur TCDD-vermittelten Induktion,  $n = 3$ )



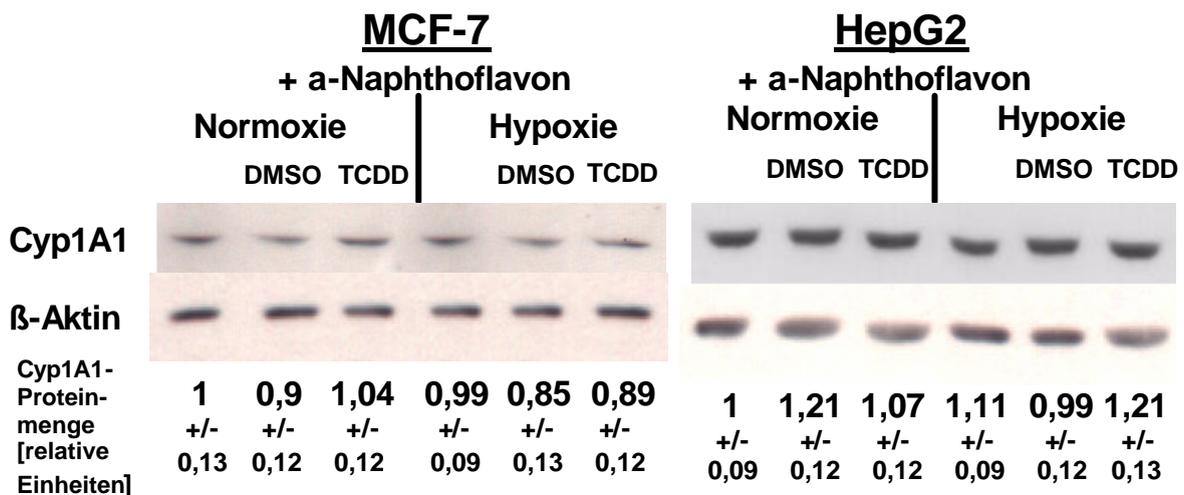
- B) Cyp1A1-mRNA-Menge in HepG2-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. Die Cyp1A1-mRNA-Menge wurde zur 18S-rRNA-Menge normalisiert. (\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a  $p < 0,05$  im Vergleich zur TCDD-vermittelten Induktion unter normoxischen Bedingungen,  $n = 3$ )



- C) Cyp1A1-Proteinmenge in HepG2-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. Die Cyp1A1-Proteinmenge wurde zur b-Aktin-Proteinmenge normalisiert. (\*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a  $p < 0,05$  im Vergleich zur TCDD-vermittelten Induktion unter normoxischen Bedingungen,  $n = 3$ )

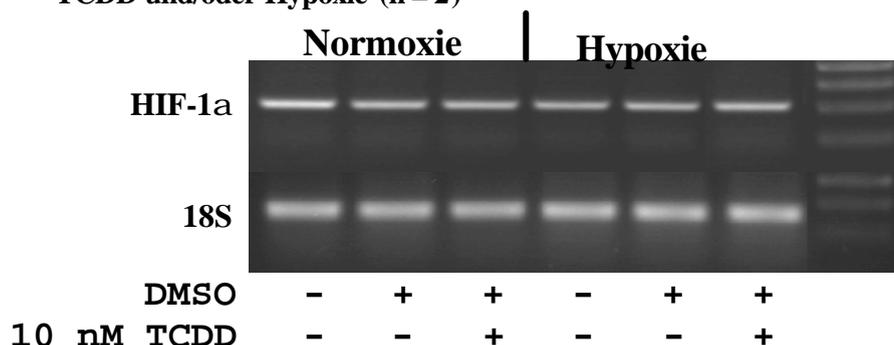


- D) Cyp1A1-Proteinmenge in MCF-7-Zellen und HepG2-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie sowie ANF. Die Cyp1A1-Proteinmenge wurde zur b-Aktin-Proteinmenge normalisiert. ( $n = 3$ )

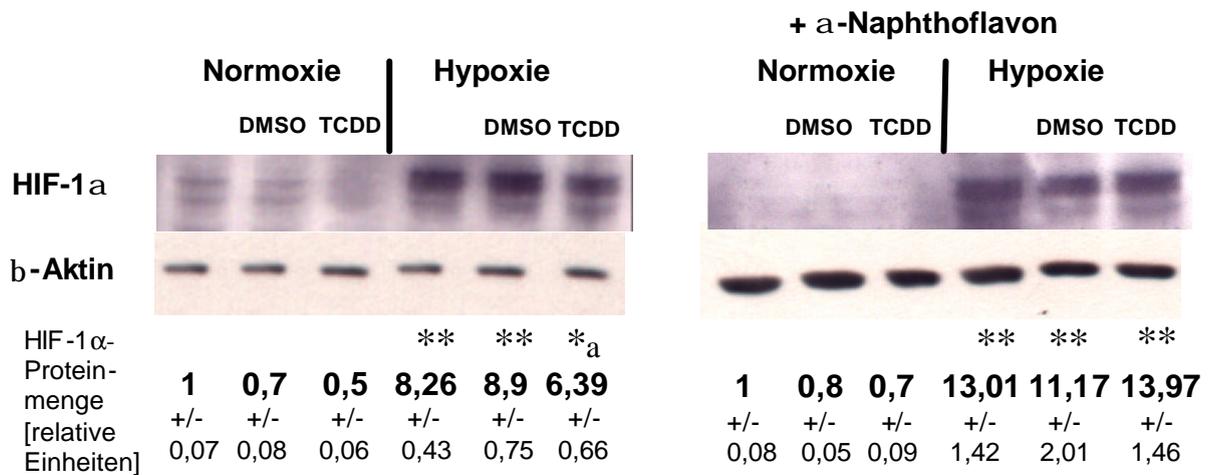


### 7.1.2 Daten zum Abschnitt „Aktivierung des HIF-1a-Signalweges nach Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie“

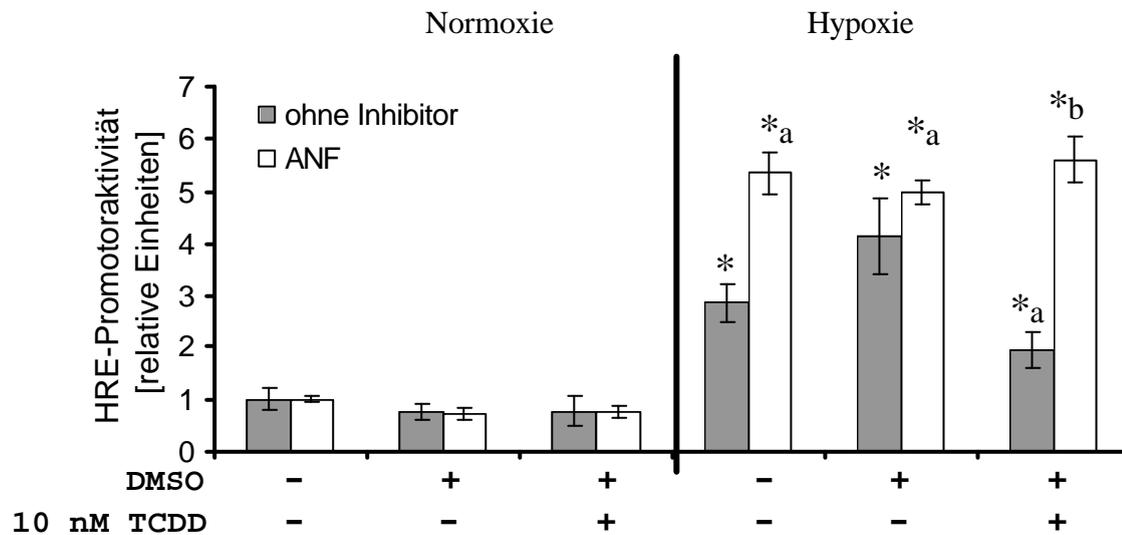
- A) Amplifikation der HIF-1a-mRNA in MCF-7-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie ( $n = 2$ )



- B) HIF-1a-Stabilisierung in HepG2-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. Die HIF-1a-Proteinmenge wurde zur b-Aktin-Proteinmenge normalisiert. (\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a  $p < 0,05$  im Vergleich zur Hypoxie-vermittelten Induktion,  $n = 3$ )

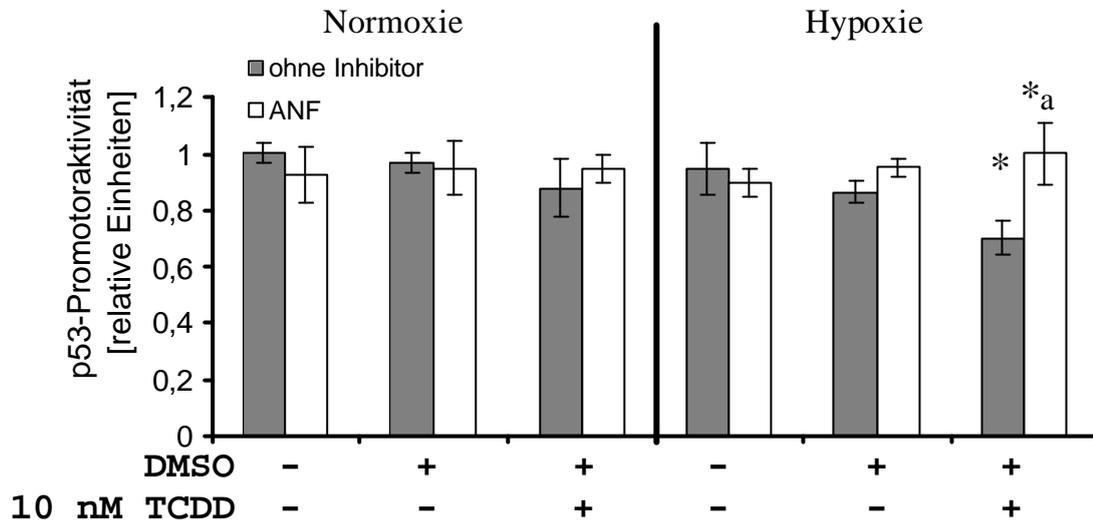


- C) HRE-Promotoraktivität in HepG2-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. Die Aktivität der *Firefly*-Luziferase wurde durch die *Renilla*-Luziferase-Aktivität normalisiert. (\*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a  $p < 0,05$  im Vergleich zur Hypoxie-vermittelten Induktion, \*b  $p < 0,05$  im Vergleich zur TCDD- und Hypoxie-vermittelten Induktion,  $n = 3$ )

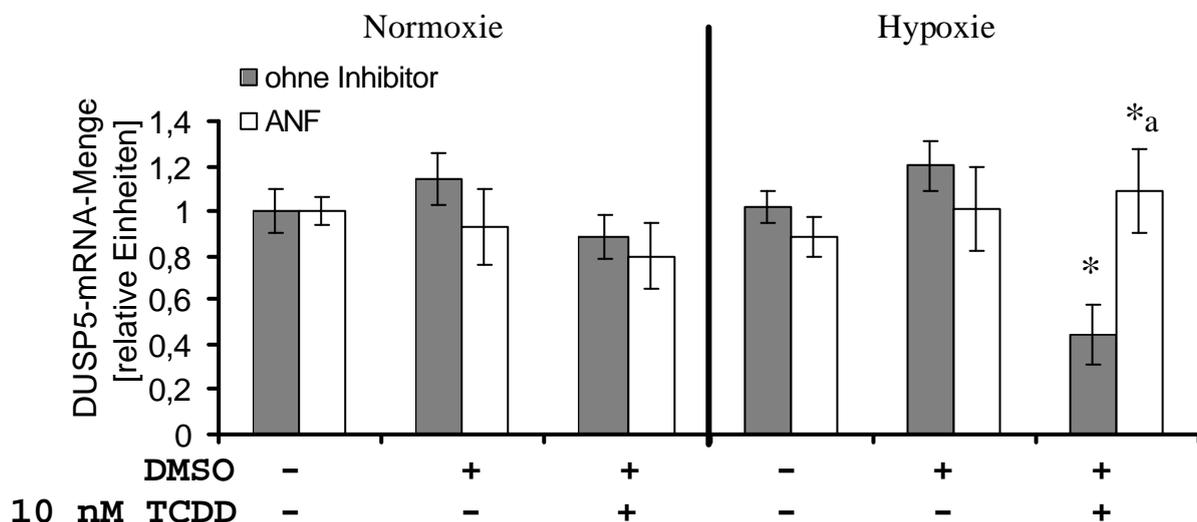


### 7.1.3 Daten zum Abschnitt „Einfluss von TCDD und Hypoxie auf den p53- und den ER $\alpha$ -Signalweg“

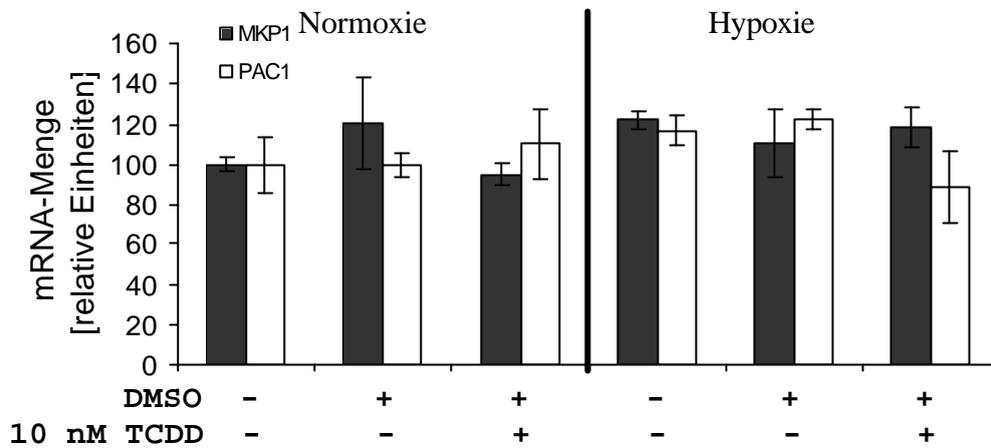
- A) p53-Promotoraktivität in MCF-7-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. Die Aktivität der *Firefly*-Luziferase wurde durch die *Renilla*-Luziferase-Aktivität normalisiert. (\* p < 0,05 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a p < 0,05 im Vergleich zur Hypoxie- und TCDD-vermittelten Reduktion, n = 3)



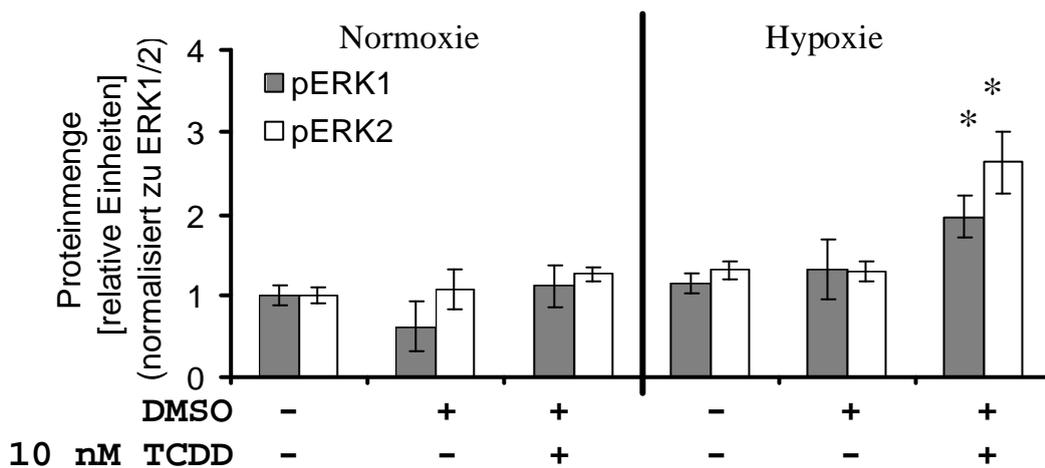
- B) Dusp5-mRNA-Menge in MCF-7-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. Die Dusp5-mRNA-Menge wurde zur 18S-rRNA-Menge normalisiert. (\* p < 0,05 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a p < 0,05 im Vergleich zur Hypoxie- und TCDD-vermittelten Reduktion, n = 3)



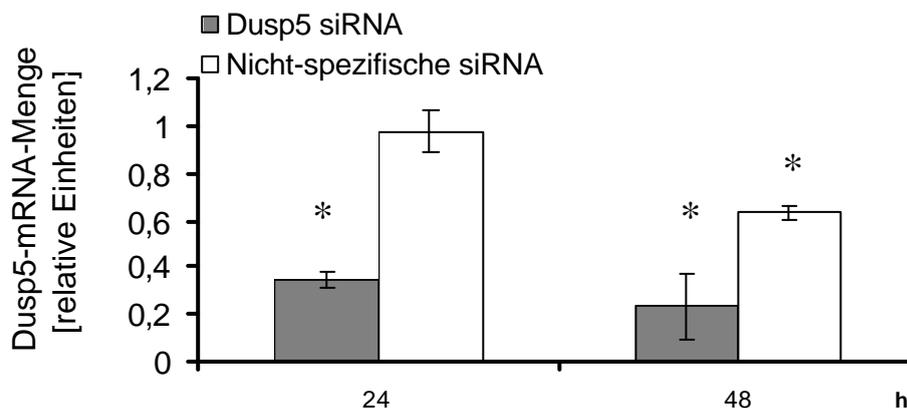
- C) Die mRNA-Menge der Phosphatasen MKP1 und PAC1 in MCF-7-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. Die mRNA-Menge der Phosphatasen MKP1 und PAC1 wurde zur 18S-rRNA-Menge normalisiert. (n = 2)



- D) Phosphorylierung der Proteine ERK1/2 in MCF-7-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. Die Proteinmenge von pERK1 bzw. pERK2 wurde zur Gesamtproteinmenge von ERK1 bzw. Erk2 normalisiert. (\* p < 0,05 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, n = 3)

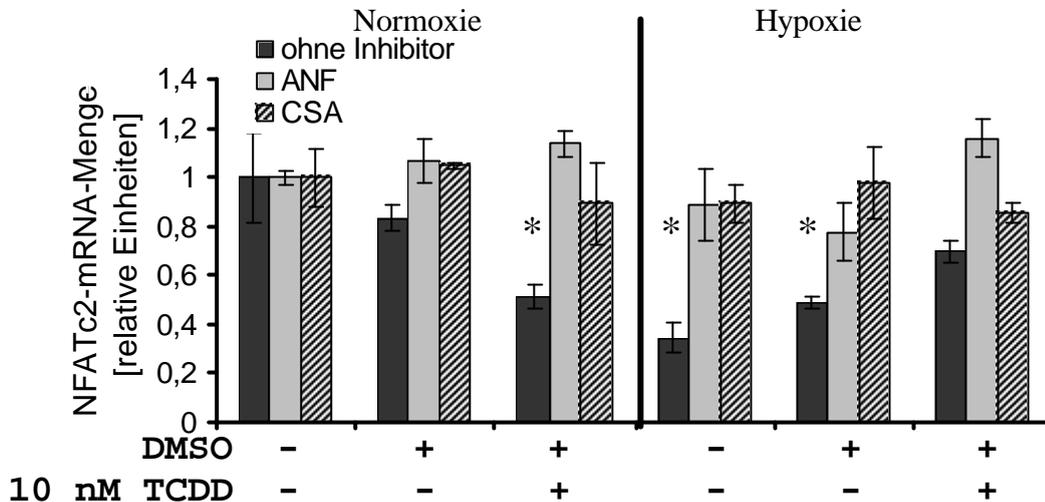


- E) Dusp5-mRNA-Menge in MCF-7-Zellen nach Transfektion mit einer nicht-spezifischen und einer spezifischen Dusp5-siRNA. Die Dusp5-mRNA-Menge wurde zur 18S-rRNA-Menge normalisiert. (\* p < 0,05 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle sowie zur nicht-spezifischen siRNA, n = 3)

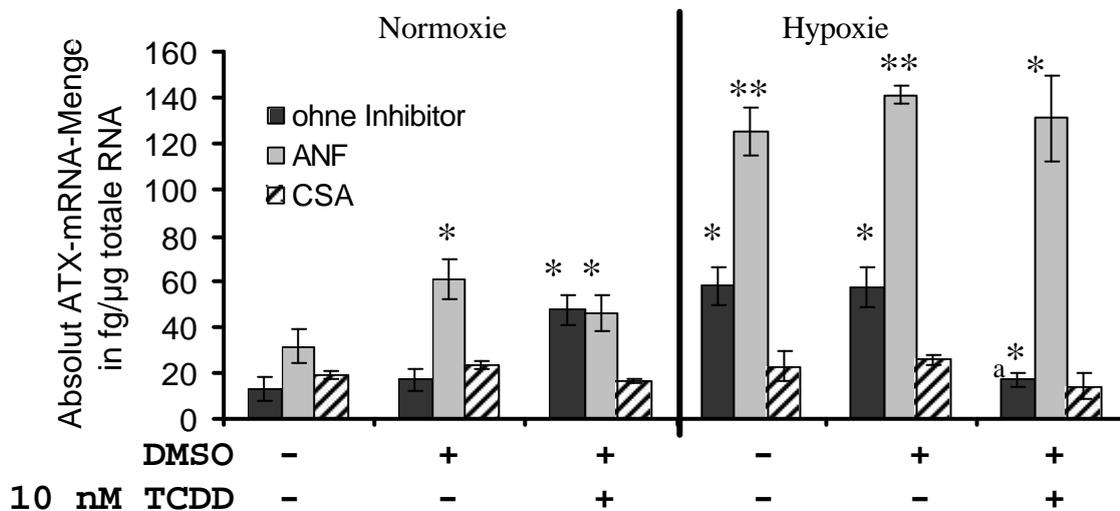


### 7.1.4 Daten zum Abschnitt „Aktivierung des NFATc1-Signalweges nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie“

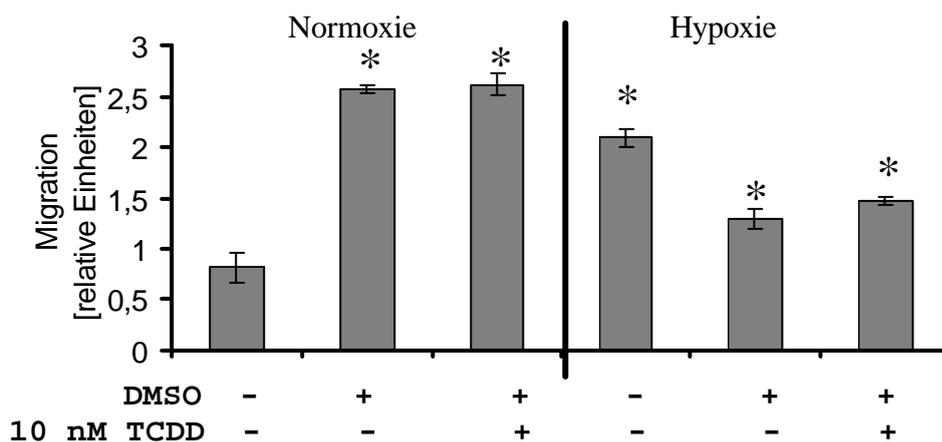
- A) NFATc2-mRNA-Menge in MCF-7-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. Die NFATc2-mRNA-Menge wurde zur 18S-rRNA-Menge normalisiert. (\*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle,  $n = 3$ )



- B) Die absolute ATX-Transkriptmenge in MCF-7-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. (\*  $p < 0,05$  oder \*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a  $p < 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TCDD oder Hypoxie,  $n = 3$ )

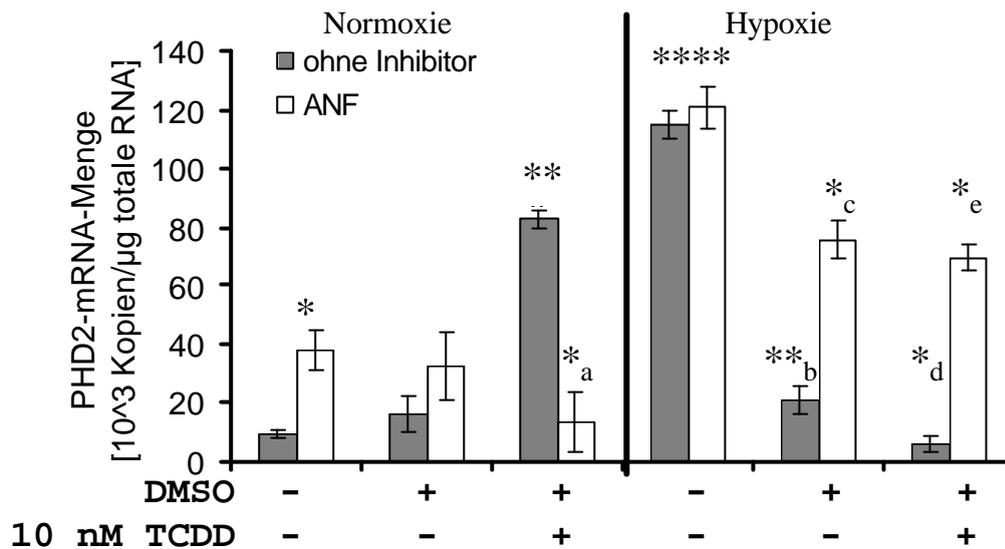


- C) Migration von ANF-behandelten MCF-7-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie (\*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle,  $n = 3$ )

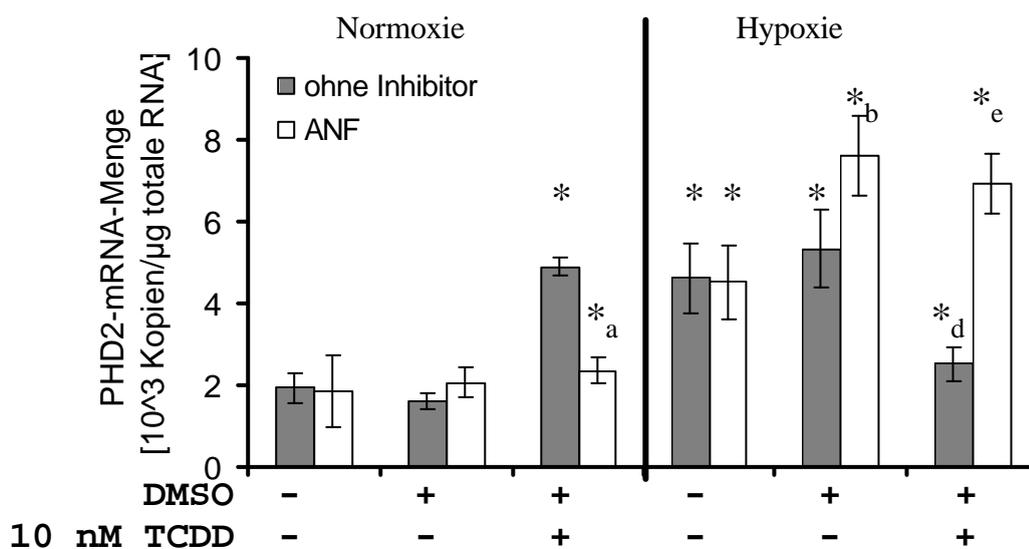


### 7.1.5 Daten zum Abschnitt „Expression von PHD2 – Ist PHD2 der Mediator der Interferenz?“

- A) Die absolute PHD2-mRNA-Menge in MCF-7-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. (\*  $p < 0.05$  oder \*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a  $p < 0.05$  im Vergleich zur TCDD-vermittelten Induktion, \*\*b  $p < 0.05$  im Vergleich zur hypoxischen Induktion, \*c  $p < 0.05$  im Vergleich zur ANF-behandelten hypoxischen Induktion, \*d  $p < 0.05$  im Vergleich zur hypoxischen DMSO-Kontrolle, \*e  $p < 0.05$  im Vergleich zur Stimulation mit TCDD und Hypoxie, n = 3)



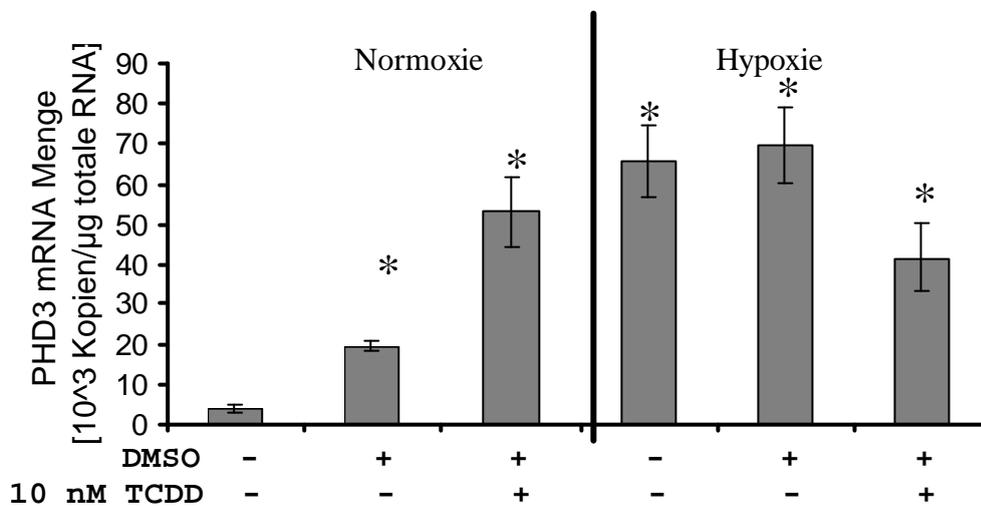
- B) Die absolute PHD2-mRNA-Menge in HepG2-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. (\*  $p < 0.05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a  $p < 0.05$  im Vergleich zur TCDD-vermittelten Induktion, \*b  $p < 0.05$  im Vergleich zur hypoxischen Induktion, \*d  $p < 0.05$  im Vergleich zur hypoxischen DMSO-Kontrolle, \*e  $p < 0.05$  im Vergleich zur Stimulation mit TCDD und Hypoxie, n = 3)



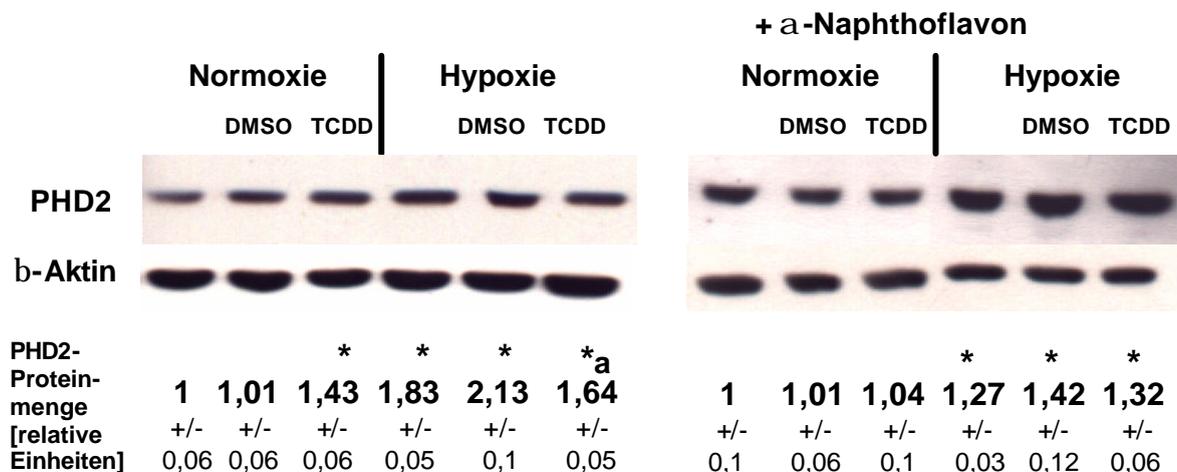
C) Die absolute PHD1-mRNA-Menge in MCF-7-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. n.d. = keine Amplifikation (n = 3)

	PHD1-mRNA-Menge unter normoxischen Bedingungen, Kopien/ $\mu$ g totaler RNA)	PHD1-mRNA-Menge unter hypoxischen Bedingungen, Kopien/ $\mu$ g totaler RNA)
Kontrolle	n.d.	85,99 +/- 6,1
DMSO	n.d.	65,25 +/- 1,5
10 nM TCDD	152,22 +/- 21	n.d.

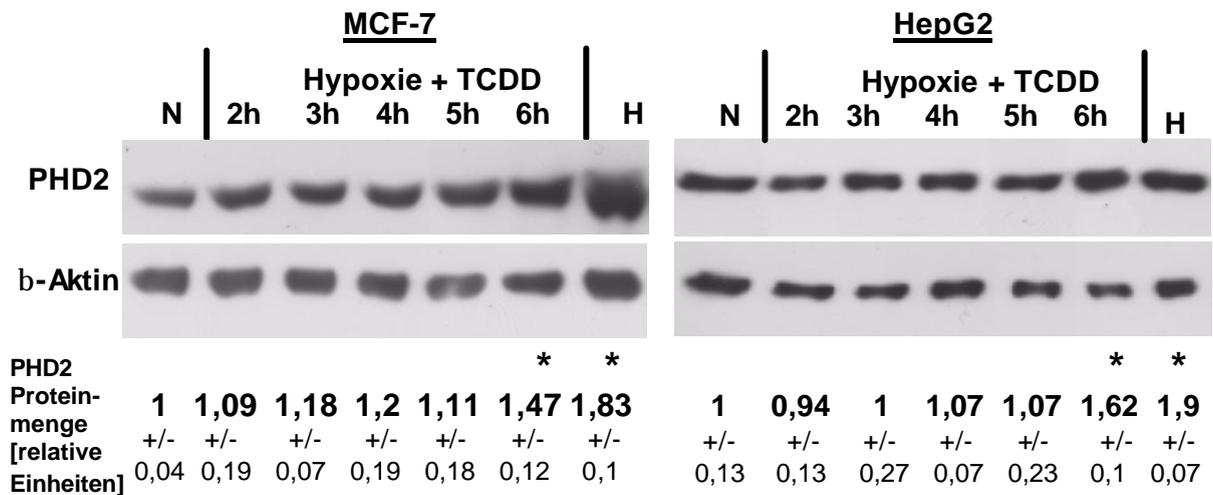
D) Die absolute PHD3-mRNA-Menge in MCF-7-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. (\* p<0.05 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, n = 3)



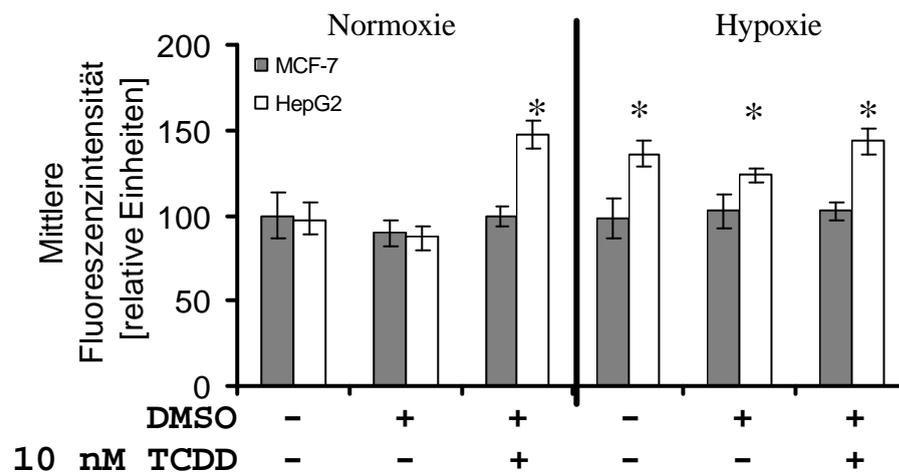
E) Die PHD2-Proteinmenge in HepG2-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. Die PHD2-Proteinmenge wurde zur b-Aktin-Proteinmenge normalisiert. (\* p<0.05 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a p<0.05 im Vergleich zur hypoxischen Induktion bzw. zur hypoxischen DMSO-Kontrolle, n = 3)



F) Zeitabhängige Induktion der PHD2-Proteinmenge in MCF-7- und HepG2-Zellen nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie. Die PHD2-Proteinmenge wurde zur b-Aktin-Proteinmenge normalisiert. N = Normoxie, H = Hypoxie (\*  $p < 0.05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle,  $n = 3$ )

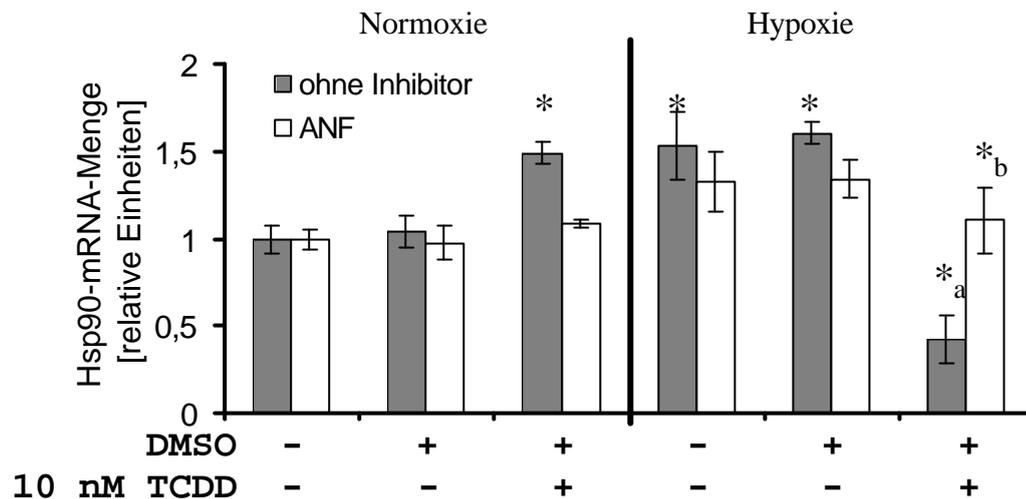


G) Die Bildung von ROS (reaktiven Sauerstoffspezies) in MCF-7- und HepG2-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. (\*  $p < 0.05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle,  $n = 3$ )

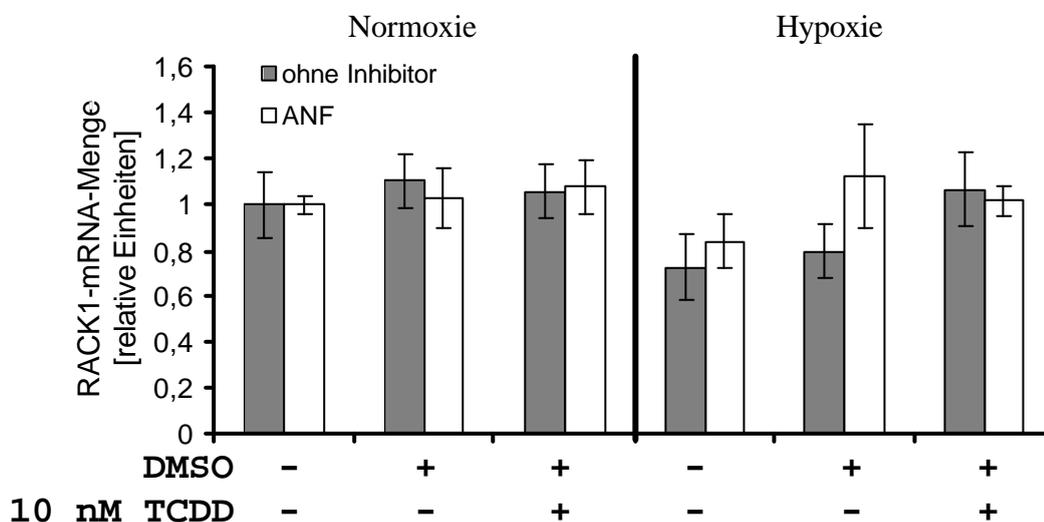


### 7.1.6 Daten zum Abschnitt „Expression of Hsp90 and Rack1 – Sind beide Proteine Mediatoren der Interferenz?“

- A) Die Hsp90-mRNA-Menge in MCF-7-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. Die Hsp90-mRNA-Menge wurde zur 18S-rRNA-Menge normalisiert. (\*  $p < 0.05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, \*a  $p < 0.05$  im Vergleich zur hypoxischen Induktion, \*b  $p < 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TCDD und Hypoxie, n = 3)



- B) Die Rack1-mRNA-Menge in MCF-7-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie. Die Rack1-mRNA-Menge wurde zur 18S-rRNA-Menge normalisiert. (n = 2)



## 7.2 Mikroarray-Daten

### 7.2.1 Durchführung der Mikroarray-Analyse

Die Mikroarray-Analyse wurde mit Hilfe des „10k human A Genchips“ (9,850 Gene, MWG Biotech, Ebersberg) und des MWG Hybridisierungsservices durchgeführt (MWG, Biotech, jetzt Octimum Biosolutions). Dafür wurden 20 µg totale RNA von stimulierten MCF-7 Zellen isoliert. Um Effekte durch Östrogen zu verhindern, wurden die MCF-7-Zellen 2 Tage in

einem Östrogen-reduzierten Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 nM TCDD und Hypoxie bzw. DMSO für 6 Stunden stimuliert. Es wurden zwei unabhängige Experimente unter diesen Bedingungen durchgeführt. Die isolierte RNA wurde für die Mikroarray-Analyse vereint. Die Induktion der Zielgene Cyp1A1 und VEGF wurde mittels RT-PCR überprüft. Deren Expression korreliert mit der in Abschnitt 3.4 beschriebenen Induktion der Transkription. Die RNA isoliert aus MCF-7-Zellen nach gleichzeitigen Stimulationen mit TCDD und Hypoxie bzw. nach Stimulation mit DMSO wurde zur Durchführung der Mikroarray-Analyse an die Firma MWG Biotech AG geschickt. Die Probenvorbereitung, die Markierung und die Hybridisierung wurden von der Firma MWG Biotech AG durchgeführt. Die Daten der Mikroarray-Analyse wurden in einem *Excel* Datenblatt (Microsoft) zur Verfügung gestellt. Diese Informationen wurden von Frau Navarrete Santos zur Verfügung gestellt. Sie wurden mit Hilfe der Software EXCEL und drei verschiedenen Signifikanz-Filtern analysiert (Yechool *et al.* 2004). Der erste Filter schloß alle Gene aus, welche einen mittleren Expressionswert hatten, der unterhalb des Hintergrundes und der Standardabweichung lag. Der zweite Filter selektierte die Gene nach der absoluten Differenz zwischen dem Mittelwert der Kontrollexperimentes und des Stimulationsexperimentes, welche höher als die Standardabweichung beider Werte sein mußte. Der Student's t-Test wurde als dritter Signifikanz-Filter verwendet, um alle Gene zu selektieren, die unter dem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  liegen. Diese Gene wurden als signifikant verändert zwischen der Kontroll- und Stimulationsgruppe definiert. Abhängig von der Funktion der Proteine wurden die kodierenden Gene in verschiedene Gruppen eingeteilt.

### 7.2.2 Ergebnisse der Mikroarray-Analyse

Im Folgenden sind die Ergebnisse dieser Mikroarray-Analyse, die die reduzierten bzw. die erhöhten Transkriptmengen zeigen, aufgeführt.

#### Erhöhte Transkriptmengen in hypoxie- und TCDD-stimulierten MCF-7-Zellen

NCBI	Symbol	Gename	Veränderung ( <i>Fold change</i> )
<b><i>Signaltransduktion</i></b>			
NM_022142	elspbp1	<i>Epididymal sperm binding protein 1 precursor</i>	4,31
NM_014930	kiaa0972	<i>Kiaa0972 protein</i>	3,96
NM_003942	rps6ka4	<i>Ribosomal protein s6 kinase, 90kd, polypeptide 4</i>	3,95
NM_005465	akt3	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3</i>	3,61
NM_020398	spinw1	<i>Eppin-3</i>	3,60
NM_015363	zim2	<i>Zinc finger, imprinted 2</i>	3,32
NM_014496	rps6ka6	<i>Ribosomal protein s6 kinase, 90kd, polypeptide 6</i>	3,24
NM_018190	flj10715	<i>Hypothetical protein flj10715</i>	3,18
NM_003027	sh3gl3	<i>Sh3-domain grb2-like 3</i>	3,11

NM_016116	asb4	<i>Asb-4 protein</i>	2,98
NM_014789	kiaa0628	<i>Kiaa0628 gene product</i>	2,89
NM_015902	dd5	<i>Progesterin induced protein</i>	2,89
NM_014882	kiaa0053	<i>Kiaa0053protein</i>	2,85
NM_012093	ak5	<i>Adenylate kinase 5</i>	2,80
NM_005459	guca1c	<i>Guanylate cyclase activator 1c</i>	2,10
<b>Metabolismus</b>			
NM_001918	dbt	<i>Dihydrolipoamide branched chain transacylase</i>	8,57
NM_003649	ddo	<i>D-aspartate oxidase isoform a</i>	3,77
NM_005536	impa1	<i>Inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1</i>	2,84
<b>Extrazellulärmatrix / strukturelle Proteine / Adhäsion</b>			
NM_006438	colec10	<i>Collectin sub-family member 10 (c-type lectin)</i>	3,51
NM_000138	fbn1	<i>Fibrillin</i>	3,21
NM_000935	plod2	<i>Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (lysine hydroxylase) 2</i>	3,10
NM_002317	lox	<i>Lysyl oxidase</i>	2,91
NM_003891	proz	<i>Protein z, vitamin k-dependent plasma glycoprotein</i>	2,87
NM_004132	habp2	<i>Hyaluronan binding protein 2</i>	2,85
NM_032727	ina	<i>Internexin neuronal intermediate filament protein, alpha</i>	2,39
<b>Rezeptoren / Kanäle / Pumpen / Wachstumsfaktoren</b>			
NM_001561	tnfrsf9	<i>Interleukin-activated receptor, homolog of mouse ly63</i>	5,43
NM_002563	p2ry1	<i>Purinergic receptor p2y, g-protein coupled, 1</i>	4,10
NM_022972	fgfr2	<i>Fibroblast growth factor receptor 2, isoform 5 precursor</i>	3,32
NM_002659	plaur	<i>Plasminogen activator, urokinase receptor</i>	3,26
NM_005684	gpr52	<i>G protein-coupled receptor 52</i>	2,97
NM_001136	ager	<i>Advanced glycosylation end product-specific receptor</i>	2,95
NM_003180	syt5	<i>Synaptotagmin 5</i>	2,88
NM_014405	cacng4	<i>Calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4</i>	2,88
NM_000743	chrna3	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3</i>	2,83
NM_001053	sstr5	<i>Somatostatin receptor 5</i>	2,78
<b>DNA / RNA / Transkriptionfaktoren</b>			
NM_012340	nfatc2	<i>Nuclear factor of activated t-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2</i>	3,38
NM_006735	hoxa2	<i>Homeo box a2</i>	3,29
NM_005522	hoxa1	<i>Homeo box a1</i>	3,11
NM_004348	runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>	2,78
NM_024865	flj12581	<i>Hypothetical protein flj12581</i>	2,57
<b>Apoptose</b>			
NM_004874	bag4	<i>Bcl2-associated athanogene 4</i>	3,06
<b>Immunologische Proteine</b>			
NM_019604	crtam	<i>Class-i mhc-restricted t cell associated molecule</i>	2,99
<b>Unbekannt</b>			
NM_021651	pro0457	<i>Pro0457 protein;</i>	3,72
NM_018071	flj10357	<i>Hypothetical protein flj10357</i>	3,5
NM_020229	prdm11	<i>Pr domain containing 11</i>	3,19
AB023430	bit	<i>Bit</i>	3,05
NM_014124	pro0255	<i>Pro0255 protein</i>	3,01

**Verminderte Transkriptmengen in Hypoxie- und TCDD-stimulierten MCF-7-Zellen**

NCBI	Symbol	Genname	Veränderung (Fold change)
<b>Signaltransduktion</b>			
XM_042940	unc5c	<i>Unc5 (c.elegans homolog) c</i>	4,33
NM_020157	otor	<i>Otoraplin</i>	3,68
NM_007034	dnajb4	<i>Dnaj (hsp40) homolog, subfamily b, member 4</i>	3,61
NM_003438	znf137	<i>Zinc finger protein 137 (clone phz-30)</i>	3,51
NM_002923	rgs2	<i>Regulator of g-protein signalling 2, 24kd</i>	3,25
NM_004052	bnip3	<i>Bcl2/adenovirus e1b 19kd-interacting protein 3</i>	2,34
NM_005345	hspa1a	<i>Heat shock 70kd protein 1a</i>	1,93
<b>Metabolismus</b>			
NM_000041	apoe	<i>Apolipoprotein e</i>	3,93
NM_004059	ccb1l	<i>Cytoplasmic cysteine conjugate-beta lyase</i>	2,80
NM_002627	pfkp	<i>Phosphofruktokinase, platelet</i>	2,09
NM_000291	pgk1	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	2,04
NM_000034	aldoa	<i>Aldolase a</i>	0,83
<b>Extrazellulärmatrix / strukturelle Proteine / Adhäsion</b>			
NM_003637	itga10	<i>Integrin, alpha 10</i>	2,85
<b>Rezeptoren / Kanäle / Pumpen / Wachstumsfaktoren</b>			
NM_000831	grik3	<i>Glutamate receptor, ionotropic, kainate 3</i>	3,66
NM_007083	nudt6	<i>Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety x) -type motif 6</i>	3,19
NM_000824	glrb	<i>Glycine receptor, beta</i>	3,16
NM_002342	ltbr	<i>Lymphotoxin beta receptor</i>	2,87
<b>DNA / RNA / Transkriptionfaktoren</b>			
NM_007084	sox21	<i>Sry (sex determining region y)-box 21</i>	4,19
NM_002040	gabpa	<i>Ga-binding protein transcription factor, alpha subunit</i>	3,23
NM_017851	flj20509	<i>Hypothetical protein flj20509</i>	2,91
NM_004259	recq15	<i>Recq protein-like 5</i>	2,81
<b>Apoptose</b>			
NM_018948	mig-6	<i>Gene 33/mig-6</i>	2,82
<b>Immunologische Proteine</b>			
NM_001700	azu1	<i>Azurocidin 1 (cationic antimicrobial protein 37)</i>	2,98
<b>Unbekannt</b>			
NM_025010	kiaa0795	<i>Hypothetical protein flj13703</i>	4,07
NM_006820	gs3686	<i>Hypothetical protein, expressed in osteoblast</i>	3,20
NM_006134	c21orf4	<i>Chromosome 21 open reading frame 4</i>	3,13
NM_014731	kiaa0552	<i>Kiaa0552 gene product</i>	3,01
NM_018576	pro1163	<i>Hypothetical protein pro1163</i>	2,87
NM_003469	scg2	<i>Secretogranin ii precursor</i>	2,86

## 8 Anhang B

### 8.1 Pufferlösungen

Agarplatten	37 g/l autoklavierter LB-Agar
DEPC-Wassers	1 ml Diethylpyrokarbonat (DEPC) in 1 Liter Wasser gelöst 4 h bei 37 °C inkubieren und anschließend autoklavieren
Glyzerol-haltiger	300 µl 50 % Glyzerol
Puffer	200 µl H <sub>2</sub> O, 500 µl Präzipitationspuffer
Ladepuffer	0,4 % (w/v) Bromphenolblau in 3 % Glycerol 1 mM EDTA 1 mg/ml SDS
LB-Kulturmedium	25 g/l LB-Medium
Lyse D Puffer	4 mM Guanidiniumisothiocyanat 25 mM Natriumcitrat, pH 7 17 mM Natriumlaurosylsarcosyl Lösen bei 65 °C 100 mM Mercaptoethanol
Moviol	65 mM Glycerol 20 % Moviol 0,2 M Tris/HCl pH 8,5
PBS	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
Ponceau S-Lösung	0,26 mM Ponceau S 18 mM Trichloressigsäure 12 mM Sulfosalicylsäure
Präzipitationspuffer	280 mM NaCl 10 mM KCl 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 mM Glukose 50 mM HEPES
Ripa Puffer	150 µM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 170 µM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 15 mM NaCl 1 % NP40 0,1 % SDS 0,5 % Natriumdeoxycholat

SDS-Probenpuffer	100 mM Tris/HCl pH 6,8 200 mM DTT 4 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % Glyzerol
Stripping-Lösung	2 % SDS 190 mM Tris/HCl pH 6,8 0,67 % Mercaptoethanol
TAE-Puffer	40 mM Tris 20 mM Natriumacetat 1 mM EDTA pH 7,8
TBST	150 mM Tris/HCl pH 7,5 0,1 M NaCl 0,1 % Tween 20
Transferpuffer	9,2 mM Tris/HCl 100 mM Glycin pH 8 20 % Methanol 0,02 % SDS
Tris/Glycin-SDS- PAGE-Laufpuffer	250 mM Tris 2,5 M Glycin pH 8,3 1 % SDS
Trypsin/PBSE	0,05 % Trypsin in PBS 5 mM EDTA
5 % Milch-TBST- Lösung	5 % Trockenmilchpulver in TBST

## 8.2 **Verwendete Geräte**

### Geräte

Axiocam Digitalkamera	Zeiss
ELISA Plattenreader	SLT Labinstrumente, Crailsheim
FACS	BD Bioscience
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Zeiss, Jena (Anregerfilter: Bandbreite 450 - 490 nm, 510 – 560 nm Emissionsfilter: Bandbreite 510 - 550 nm, 590 - 650 nm)
Gelkammer	Biometra, Göttingen
Inkubatoren	Haereus Holding

Kühlzentrifugen	Haereus Holding
Neubauer Zählkammer	Deutschland
NOVEX Gelkammern	Invitrogen
Opticon II System	MJ Research, München
Photometer Ultrospec 3300 pro	Amersham Bioscience
Sirius Luminometer	Berthold Detektion System
Schüttler 3006	Schütt Labortechnik
Trio-Thermoblock	Biometra
<i>XCell II Blot Modul</i>	Invitrogen
Zentrifuge Biofuge	Haereus Holding

### **Software**

ANOVA	
Bio1D Software	LTF, Wasserburg
CellQuest-Software	BD Bioscience
Microsoft Office	
Software Axiovision 2.05	Zeiss, Jena
Sigma Plot	

### **8.3 Primer**

Zur Quantifizierung der mRNA-Mengen wurden zwei Methoden verwendet: die semi-quantitative PCR (SQ) und die *Real time* PCR (RT).

Name	Sequenz 5'→3'	Quantifiziertes Gen	Methode
18S Fw	GTTGGTGGAGCGATTTGTCTGG	18S rRNA	SQ/RT
18S Rev	AGGGCAGGGACTTAATCAACGC	18S rRNA	SQ/RT
Cyp1A1 Fw	AGGACTAGGGCTGGAGTGAG	Cytochrom P450 1A1	RT
Cyp1A1 Rev	CAAGCATGCAAGCTCAATG	Cytochrom P450 1A1	RT
HIF-1 $\alpha$ Fw	CCACCTATGACCTGCTTGGT	HIF-1 $\alpha$	SQ
HIF-1 $\alpha$ Rev	TATCCAGGCTGTGTCGACTG	HIF-1 $\alpha$	SQ
NFATc2 Fw	CTGACACCTTCTCCCCCTACAC	NFATc2	RT
NFATc2 Rev	CTGGTTCGAGGTGACATTATTGG	NFATc2	RT
PHD1 Fw	AGCCCCTAAGTCAGGCTCTC	PHD1	RT
PHD1 Rev	AGTGGTAGAGGTGGCTGTGG	PHD1	RT
PHD2 Fw	GGACTGGAAGAAGCACAAAGC	PHD2	RT
PHD2 Rev	GGCCTTTACTTTTCCCTTGG	PHD2	RT
ATX Fw	GTTGCAAGGAAACCTTTGGA	Autotaxin	RT

Name	Sequenz 5'→3'	Quantifiziertes Gen	Methode
VEGF Fw	AAGGAGGAGGGCAGAATCAT	VEGF	RT
VEGF Rev	CACACAGGATGGCTTGAAGA	VEGF	RT
ATX Rev	AACTTCCTCTGGCATGGTTG	Autotaxin	RT
PHD3 Fw	ATGCTGAAGAAAGGGCAGAA	PHD3	RT
PHD3 Rev	CCACACACAAGACAGGGATG	PHD3	RT
Hdm2 Fw	GGTGGGAGTGATCAAAAGGA	Hdm2	RT
Hdm2 Rev	ACACAGAGCCAGGCTTTCAT	Hdm2	RT
Hsp90 Fw	TGGTGACATCTCCATGCTGT	Hsp90	RT
Hsp90 Rev	AGACAGGAGCGCAGTTTCAT	Hsp90	RT
Dusp5 Fw	GGAGGCCTTCGATTACATCA	Dusp5	RT
Dusp5 Rev	AGGGCTCAGTGTCTGCAAAT	Dusp5	RT
Mkp1 Fw	CTGCCTTGATCAACGTCTCA	Mkp1	RT
Mkp1 Rev	ACCCTTCCTCCAGCATTCTT	Mkp1	RT
Pac1 Fw	TGTGGAGATCTTGCCCTACC	Pac1	RT
Pac1 Rev	CTCCACCATCTGGTTGTCCT	Pac1	RT
SOCS3 Fw	CTCTCCTGGTTGGCTTCTTG	SOCS3	RT
SOCS3 Rev	GTGGCCACTCTTCAGCATCT	SOCS3	RT
Rack1 Fw	TGAGTGTGGCCTTCTCCTCT	RACK1	RT
Rack1 Rev	GCTTGCAGTTAGCCAGGTTC	RACK1	RT

## 8.4 Verwendete Vektoren/siRNA

### 8.4.1 Sequenzen der verwendeten siRNA

Name der siRNA	Reprimierte mRNA	Sequenz 5'→ 3'
Dusp5 siRNA	Dusp5	CCCUUCCUCUACCUUGGAATT
GFP siRNA	GFP	GCUGACCCUGAAGUUCAUCTT
Rack1 siRNA	RACK1	CUGACCAGGGAUGAGACCATT

Natürliche RNA-Interferenz ist ein ATP-abhängiger Prozeß, der doppelsträngige RNA in 21 bis 23 Nukleotide lange siRNAs durch das Enzym RNase III Dicer spaltet. Diese siRNAs werden mit den *RNA induced silencing complex (RISC)* verbunden. Das Entwinden der siRNA aktiviert den *RISC*-Komplex. Der *RISC*-Komplex erkennt die RNA sequenzspezifisch, wobei Unterschiede von 1 oder 2 Nukleotiden in der Zielsequenz die RNA-Interferenz verhindern. Bestimmt durch den Antisense-Strang der siRNA erkennt und katalysiert der *RISC*-

Komplex mit Hilfe von Endonukleasen die enzymatische Spaltung der komplementären mRNA im Zytoplasma.

Die experimentell zum Einsatz kommenden synthetischen doppelsträngigen RNAs, die aus 19 Nukleotiden mit einem Überhang von 2 Nukleotiden am 3' Ende bestehen, entsprechen den siRNA, durch das Enzym RNase III Dicer gebildet werden (Hannon *et al.* 2002; Hutvagner *et al.* 2002; McManus *et al.* 2002; Tuschl *et al.* 2001; Tuschl *et al.* 2002).

#### 8.4.2 verwendeten Vektoren

Die Luziferase-Expressionsvektoren pp53-Luc (Clontech laboratories), pTaI-Luc/XRE (Tonack *et al.* 2007), pNFAT-Luc (Stratagene), pHSE-Luc (Clontech laboratories) und pTAL-Luc/ERE (Hombach-Klonisch *et al.* 2006) wurde zur Überprüfung des Inserts mit den Restriktionsenzymen BamHI, XhoI und XmaI geschnitten. Die Grundvektoren pTAL-Luc (BD Bioscience) und cis-Reporter Vektor (Stratagene) wurden als Kontrolle bei jedem Restriktionsverdau mitgeführt. Die Funktionalität der Reporter-genvektoren wurde mit Hilfe des *Dual-Luciferase®Reporter Assay System* (Promega) überprüft. Im Folgenden sind die Sequenzen der Promoterelemente und die verwendeten positive Kontrollen zur Induktion der Reporter-gen-Aktivität aufgeführt.

Sequenz der *Response*-Elemente (RE) und deren positiv Kontrollen zur Aktivierung

Respons- element	Sequenz 5' → 3'	Positiv Kontrolle
NFAT	(GGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT) <sup>4</sup>	400 ng/ml Ionomycin, 100 ng/ml PMA
HSE (Hitze- schock-RE)	TAGAATGTTCTAGATCTAGAACATTCTAGCTAGAATGTTCTAG	40°C
p53	ACGTTTGCCTTGCCTGGACTTGCCTGGCCTTGCCTTGGACATG	15 µg/ml Mitomycin C
XRE (xenobio- tisches RE)	(CCTTCTCACGCAACGCCTGG) <sup>3</sup>	10 nM TCDD
ERE (ER- RE)	(CCCGGTCAGCCTGACCCGCA) <sup>3</sup>	10 nM Östrogen

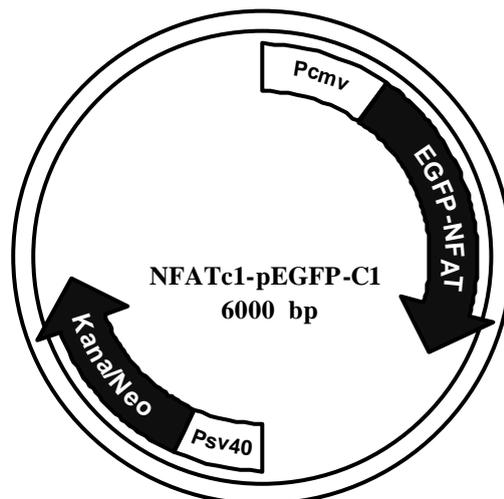
Weiterhin wurden die Vektoren pH3SVL (Martin *et al.* 2005) bzw. pGL3b(1454-3164)P2P-wt sowie pGL3b(1454-3164)P2P-mt (Metzen *et al.* 2005) als Indikatoren zur Aktivierung des

HIF-1 $\alpha$ -Signalweges bzw. der PHD2-Expression verwendet. Der Vektor pGL3b(1454-3164)P2P-wt enthält die oberhalb des Startkodons liegenden Basenpaare 1454 bis 3164 des Wildtyp-PHD2-Promotors. Dieser Promotorbereich enthält ein funktionelles HRE. Der Vektor pGL3b(1454-3164)P2P-mt enthält denselben Promotorbereich mit dem Unterschied, dass das funktionelle HRE durch Mutagenese entfernt wurde.

Der Vektor pRLSV40 (Clontech laboratories) kodiert die *Renilla*-Luziferase. Die *Renilla*-Luziferase wird nur durch die Effizienz der Transfektion beeinflusst. Die Expression erfolgt aufgrund des SV40- Promotors konstitutiv.

Die Vektoren pEGFP-C3/AhR (Tonack *et al.* 2007) und pEGFP-C3/NFAT (freundlicherweise von Steffi Rau, Forschungsgruppe für Enzymologie und Proteinfaltung der Max-Planck-Gesellschaft, zur Verfügung gestellt bekommen) wurden zur Überprüfung des Inserts mit den Restriktionsenzymen XhoI, EcoRI und NotI geschnitten. Der Grundvektor pEGFP-C3 (BD Bioscience) wurde als Kontrolle bei jeden Restriktionsverdau mitgeführt.

Der Vektor pEGFP-C3/NFAT wurde bis heute noch nicht veröffentlicht und ist im Folgenden schematisch dargestellt.



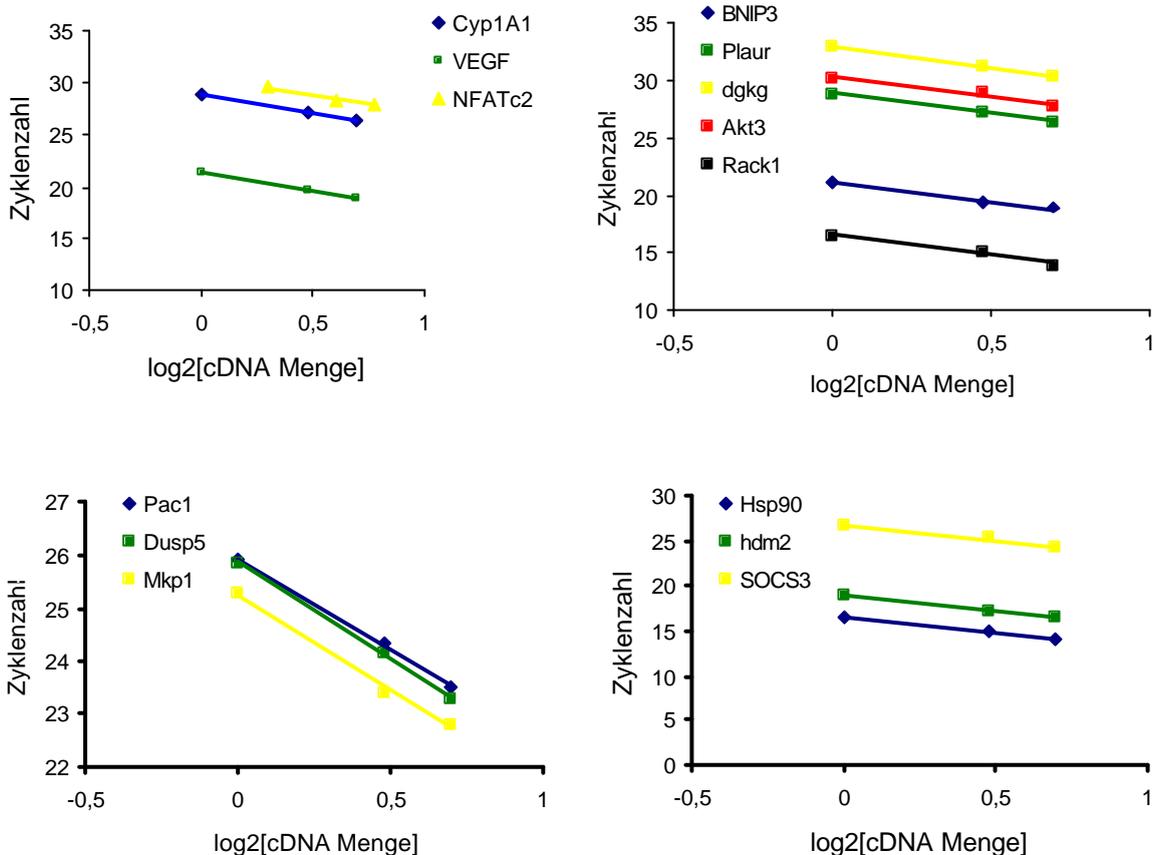
## 8.5 Standardkurven Real-time PCR

### 8.5.1 Relative Quantifizierung

Die Standardkurve gibt den linearen Zusammenhang zwischen dem Ct-Werten und dem Logarithmus der Konzentration des Standards wieder. Durch die Verdünnung eines cDNA-Gemisches kann über die Ct-Werte eine Eichgerade gebildet werden. Diese Eichgerade wird durch eine Geradengleichung  $y = f(x)$ ,  $y = m * x + n$  definiert. Der Anstieg (m) gibt die Effizienz der PCR wieder. Ein Anstieg von -3,3 entspricht einer Effizienz von 100 %. Die mittleren Effizienzen der Quantifizierung der einzelnen mRNAs sind der folgenden Zusammenstellung zu entnehmen.

Amplifikat	Anstieg	R <sup>2</sup>	Amplifikat	Anstieg	R <sup>2</sup>
Cyp1A1	-3,5269	0,9994	Hsp90	-3,3938	0,9987
VEGF	-3,4878	0,9998	hdm2	-3,4992	0,9977
NFATc2	-3,3717	0,9867	SOCS3	-3,4475	0,9697
BNIP3	-3,4354	0,9967	Pac1	-3,3861	0,999
Plaur	-3,4148	0,9988	Dusp5	-3,6394	0,9991
dgkg	-3,5274	0,9999	Mkp1	-3,5541	0,9943
Akt3	-3,4713	0,9689	Rack1	-3,501	0,976

Im Folgenden sind die dazugehörigen Standardkurven aufgeführt.

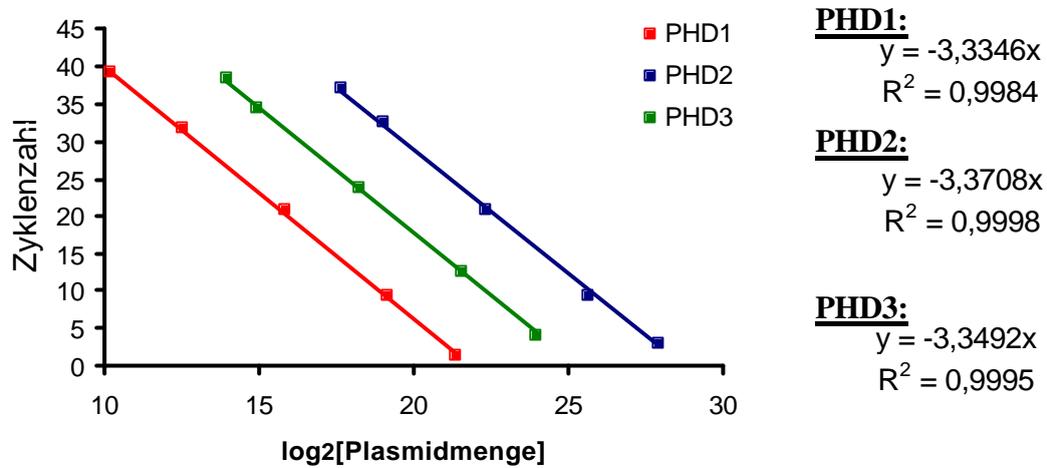


### 8.5.2 Absolute Quantifizierung

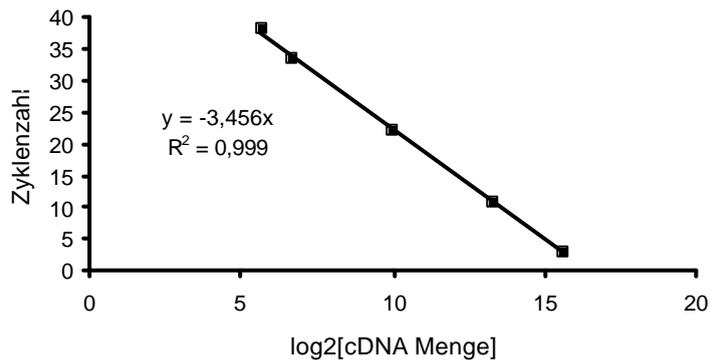
Durch die Verdünnung des Standards kann über die  $C_t$ -Werte eine Eichgerade gebildet werden. Diese Eichgerade wird durch eine Geradengleichung  $y = f(x)$ ,  $y = m \cdot x + n$  definiert. Der Anstieg ( $m$ ) gibt die Effizienz der PCR wieder. Den Standard im Falle der absoluten Quantifizierung der PHD-Isoformen bildeten Verdünnungsreihen von Plasmiden, welche die Sequenz der einzelnen PHD-Isoformen enthalten. Die Konzentration der PHD-Plasmide sind

pENTRPHD1	$1 \mu\text{g/ml} = 2,5694 \cdot 10^{11}$ Kopien/ $\mu\text{l}$
pENTRPHD2	$1 \mu\text{g/ml} = 2,5315 \cdot 10^{11}$ Kopien/ $\mu\text{l}$
pENTRPHD3	$1 \mu\text{g/ml} = 2,9620 \cdot 10^{11}$ Kopien/ $\mu\text{l}$

Im Falle der absoluten Quantifizierung der ATX-mRNA-Menge wurde ein cDNA-Standard eingesetzt.



Im Folgenden ist die Standardgerade des ATX Standards aufgeführt.



## 8.6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>8.6.1 Abbildungsverzeichnis:</b>	<b>Seite</b>
Abb. 1-1: Schema der HIF-1 $\alpha$ -Struktur	4
Abb. 1-2: Proteosomaler Abbau von HIF-1 $\alpha$	5
Abb. 1-3: Reaktionsschemata der HIF-Hydroxylasen	8
Abb. 1-4: Der HIF-1 $\alpha$ -Signalweg	10
Abb. 1-5: Struktur des 2,3,7,8-Tetrachloro-dibenzo- <i>para</i> -dioxin (TCDD)	14
Abb. 1-6: Struktur des AhR	15
Abb. 1-7: Der AhR-Signalweg	17
Abb. 1-8: Die Interferenz zwischen dem AhR- und HIF-1 $\alpha$ -Signalweg	21
Abb. 2-1: Stimulationsschemata	25
Abb. 2-2: Reaktionen der <i>Firefly</i> - und <i>Renilla</i> -Luziferase	30
Abb. 2-3: Auswertung der quantitative <i>Real-time</i> -PCR	36
Abb. 2-4: Schmelzpunktcurve des Cyp1A1-Amplifikates	37
Abb. 2-5: Schematischer Aufbau des Blots	39
Abb. 2-6: Reaktionen zum Nachweis der Lysophospholipase D Aktivität	41
Abb. 3-1: Konzentrationsabhängige Induktion der Cyp1A1-mRNA-Menge durch TCDD nach 24 Stunden in MCF-7-Zellen.	44
Abb. 3-2: Inhibierung der Cyp1A1-mRNA-Menge (A) und Lokalisation des AhR-GFP-Fusions-Proteins (B) in MCF-7-Zellen.	45
Abb. 3-3: Zeitabhängige Induktion der relativen Cyp1A1-mRNA-Menge durch 10 nM TCDD in MCF-7-Zellen.	46
Abb. 3-4: Akkumulierung von HIF-1 $\alpha$ (A) und Induktion der relative VEGF-mRNA-Menge (B) unter hypoxischen Bedingungen in MCF-7-Zellen.	47
Abb. 3-5: XRE-Promotoraktivität nach 24-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie in MCF-7-Zellen.	48
Abb. 3-6: Cyp1A1-mRNA-Menge (A) und Proteinmenge (B) nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie in MCF-7-Zellen.	49
Abb. 3-7: HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie in MCF-7-Zellen.	50
Abb. 3-8: HRE-Promotoraktivität (A) und die relative VEGF-mRNA-Menge (B) nach Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie in MCF-7-Zellen.	51
Abb. 3-9: p53-Proteinmenge (A) und Hdm2-Transkriptmenge (B) in MCF-7-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie.	53
Abb. 3-10: Dusp5-Proteinmenge in MCF-7-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie.	54
Abb. 3-11: Phosphorylierung der Proteine ERK1/2 (A) und die ERE-Promotoraktivität (B) in MCF-7-Zellen nach Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie.	55
Abb. 3-12: Relative SOCS3-mRNA-Menge (A) und die ER $\alpha$ -Proteinmenge in MCF-7-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie.	56
Abb. 3-13: Dusp5-Proteinmenge in MCF-7-Zellen nach Behandlung mit einer nicht-spezifischen und einer spezifischen Dusp5-siRNA.	57
Abb. 3-14: Die pERK1/2-Proteinmenge (A), die ERE-Promotoraktivität (B) und die SOCS3-mRNA-Menge (C) in MCF-7-Zellen nach Behandlung mit einer nicht-spezifischen und einer spezifischen Dusp5-siRNA.	58
Abb. 3-15: Die Hdm2-mRNA-Menge in MCF-7-Zellen nach Behandlung mit einer nicht-spezifischen und einer spezifischen Dusp5-siRNA.	59

	<b>Seite</b>
Abb. 3-16: NFAT-Promotoraktivität nach 24-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie in MCF-7-Zellen.	60
Abb. 3-17: Lokalisation von NFATc1 in MCF-7-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie.	61
Abb. 3-18: NFATc1-Proteinmenge (A) und ATX-vermittelte Cholin-Bildung (B) in MCF-7-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie.	62
Abb. 3-19: Migration von MCF-7-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit TCDD und/oder Hypoxie (A) bzw. nach 24-stündiger Stimulation mit den ATX-Substrat LPA oder dem Enzymprodukt LPC (B).	64
Abb. 3-20: TCDD und Hypoxie beeinflussen die PHD2-Proteinmenge (A) und die PHD2-Promotoraktivität (B) in MCF-7-Zellen.	66
Abb. 3-21: Die HSE-Promotoraktivität (A) und die Hsp90-Proteinmenge (B) nach Stimulation mit TCDD und Hypoxie in MCF-7-Zellen.	68
Abb. 3-22: Rack1-Proteinmenge in MCF-7-Zellen nach der Transfektion einer nicht-spezifischen und einer spezifischen Rack1-siRNA.	70
Abb. 3-23: HRE-Promotoraktivität (A) und HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung (B) in MCF-7-Zellen nach Transfektion mit einer nicht-spezifischen und einer Rack1-spezifischen siRNA.	71
Abb. 4-1: A) Netzwerk der TCDD-vermittelten Inhibierung des p53-Signalweges sowie die Induktion des ER $\alpha$ -Signalweges in MCF-7-Zellen unter hypoxischen Bedingungen.	81
Abb. 4-2: Der Sauerstoff-PHD-VHL-unabhängige Abbau von HIF-1 $\alpha$ über das Protein Rack1 sowie die AhR-vermittelte, verringerte Hsp90-Expression nach gleichzeitiger Stimulation mit TCDD und Hypoxie ist dargestellt.	90
<b>8.6.2 Tabellenverzeichnis:</b>	<b>Seite</b>
Tabelle 2-1: Verwendete Zusätze zur Zellkultur	24
Tabelle 2-2: Verwendete Vektoren zur Transfektion mit kationischen Lipiden	28
Tabelle 2-3: Verwendete siRNA zur Transfektion mit kationischen Lipiden	28
Tabelle 2-4: Verwendete Vektoren zur Calciumphosphat-Kopräzipitation	29
Tabelle 2-5: verwendete Primer zur <i>in vitro</i> Transkription	34
Tabelle 2-6: Pipetierschema für Polyakrylamidgele	38
Tabelle 2-7: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper	39

## 8.7 Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	eIF-4E Bindeprotein 1
7-AAD	7-Amino-Actinomycin
Abb.	Abbildung
AF1	<i>activating function 1</i>
AP1	<i>activating protein 1</i>
AhR	Arylhydrokarbon Rezeptor
AhRR	AhR Repressor
AK	Antikörper
Akt3	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3</i> ( <i>protein kinase b, gamma</i> )
ANF	$\alpha$ -Naphthoflavon
ARD1	<i>arrest defective protein 1 homologue</i>
ARNT	<i>aryl hydrocarbon nuclear receptor translocator</i>
As	Aminosäure
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
BNIP3	<i>bcl2/adenovirus e1b 19kd-interacting protein 3</i>
Bp	Basenpaare
<i>BRCA1/2</i>	<i>Breast cancer 1</i>
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CRM1	<i>chromatin region maintenance 1</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>
C-TAD	C-terminale Transaktivierungsdomäne
Cul	Cullin
Cyp1A1	Cytochrom P450 1A1
DCF	2',7'-Dichlorofluoreszein
DCIS	duktale Karzinom <i>in situ</i>
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DES	Diethylstilöströl
Dgkg	<i>diacylglycerolkinase gamma</i>
DMEM	<i>Dulbecco`s modified Eagel`s medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
Dusp5	Dual spezifische Phosphatase 5
E	Glutaminsäure
EDCs	<i>endocrine disrupting chemicals</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	endothelialer Wachstumsfaktor
EGFP	verstärktes GFP
EDG	<i>endothelial differentiation gene</i>
eIF-4E	eukaryotischen Initiationsfaktor 4E
ER	Östrogen Rezeptor
ERE	ER-spezifisches <i>Response-Element</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	fluoreszenzaktivierter Zellsorter
FBS	<i>fetal bovine serum</i>

FSC	Vorwärtsstreulicht
FIH-1	<i>factor-inhibiting HIF-1</i>
FRAP	FKBP-Rapamycin assoziiertes Protein
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST Ya	Glutathion S-Transferase Ya
h	Stunde
H <sub>2</sub> DCFDA	2',7'-Dichloro-fluoresceindiacetat
HAH	halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe
Hdm2	humane Homologe zum mdm2
HECT	Homologen zu E6-AP C-Terminus
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierte Faktor-1 $\alpha$
HLH	Helix-Schleifen-Helix-Motiv
HRE	Hypoxie <i>Response</i> -Element
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
IARC	<i>international agency for research on cancer</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-8	Interleukin-8
IPAS	<i>Inhibitory PAS domain protein</i>
IPTG	Isopropyl-beta-thiogalactopyranosid
iXRE	inhibitorische XRE
JNK	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminalen Kinase
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LCIS	lobuläre Karzinom <i>in situ</i>
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPA	Lysophosphatidylsäure
Luc	Luciferase
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinasen
MAPKK	Mitogen aktivierte Proteinkinasen Kinase
MCF-7	Michigan Cancer Foundation
mdm2	<i>mouse double minute 2</i>
MEM	<i>Minimal essential medium</i>
MKP1	MAPK Phosphatase 1
MMLV	Moloney-Maus-Leukämie-Virus
NAC	N-acetylcystein
NCBI	<i>National Cancer Biology Institute</i>
NES	Kernexportsignal
NF1	<i>nuclear factor 1</i>
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NLS	Kernlokalisierungssignal
N-TAD	N-terminale Transaktivierungsdomäne
ODDD	sauerstoffabhängige Degradationsdomäne ( <i>oxygen-dependent degradation domain</i> )
P	Proline
PAC1	<i>Phosphatase of activated cells 1</i>
PAH	polyzyklischen, aromatischen Hydrokarbonen
PAS	Per-ARNT-SIM
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

---

PCB	polychlorierten Biphenyle
PCDD	Dibenzo- <i>p</i> -dioxine
PCDF	polychlorierten Dibenzofurane
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Per	<i>Peroid</i>
PEST	Sequenz, die reich an den Aminosäuren Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) ist
PFA	Para-Formaldehyd
PHD	<i>prolyl hydroxylase domain containing</i> Protein
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
Plaur	<i>plasminogen activator, urokinase receptor</i>
pVHL	<i>protein von-Hippel Lindau</i>
RACK1	<i>receptor of activated C-kinase 1</i>
RE	<i>Response-Element</i>
REF1	Redox-Faktor 1
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
<i>Ripa</i>	<i>radio-immuno-precipitation-assay</i>
<i>RISC</i>	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktiven Sauerstoffspezies
S	Serin
SCF	Skp1-Cul1-F-box Proteine
SDS	Natriumdodecylsulfat
Siah1/2	<i>Seven in Absentia homologue-1</i>
SIM	<i>Single-minded</i>
siRNA	<i>small interfering RNAs</i>
SOCS3	<i>Suppressor of cytokine signalling 3</i>
SRC1	<i>Steroid receptor coactivator 1</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht
T	Threonin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBB	4, 5, 6, 7-Tetrabromobenzotriazol
TBS	trisgepufferte Kochsalzlösung
TBST	trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TCDD	2,3,7,8-Tetrachloro-dibenzo- <i>p</i> -dioxin
TEF	Toxizitätsäquivalentsfaktor
TIF2	<i>Transcription intermediary factor 2</i>
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Tris	Tri(hydroxymethyl)-aminomethan
UGT1A1	UDP-Glucuronosyltransferase 1A1
VCB	pVHL-Elongin C-Elongin B Komplex
VEGF	vaskularer endothelialer Wachstumsfaktor
WHO	<i>World Health Organisation</i>
Wip1	<i>wildtyp p53 inducible phosphatase 1</i>
XAP2	<i>hepatitis B virus X-associated protein 2</i>
XRE	xenobiotische <i>Response-Element</i>

## Danksagung

Abschließend möchte ich mich recht herzlich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. Fischer danke ich für die Überlassung dieser interessanten Fragestellung, für die Möglichkeiten der Diskussion meiner Ergebnisse und für die Hilfe und guten Ratschläge bei der Anfertigung der zu publizierenden Manuskripte. Ich danke auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Fischer für die kritische Diskussion zur Vorbereitung von Posterpräsentationen und Vorträgen sowie während der Seminare.

Herrn Prof. Dr. Krauß (Institut für Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) möchte ich für die Möglichkeit danken, dass ich innerhalb des Graduiertenkollegs „Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe“ meine Ergebnisse präsentieren konnte.

Herrn Prof. Dr. Dr. Fischer und Herrn Prof. Dr. Krauß möchte ich zusätzlich für das Ermöglichen eines Forschungsaufenthaltes bei Herrn Prof. Dr. Klonisch im *Department of Anatomy and Cell Science* der Universität von Manitoba in Kanada danken.

Frau Dr. Navarette Santos (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) danke ich für die Hilfe bei der Anfertigung der zu publizierenden Manuskripte. Frau Dr. Tonack (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) danke ich für die Bereitstellung der Vektoren pTa<sub>1</sub>-Luc/XRE und pEGFP-C3/AhR.

Herrn Prof. Dr. Klonisch und Dr. Hombach Klonisch (*Department of Anatomy and Cell Science* der Universität von Manitoba, Kanada) möchte ich für die Bereitstellung des Vektors pERE-Luc, die Diskussionsbereitschaft zur Wechselwirkung des AhR- und ER $\alpha$ -Signalweges sowie für die Hilfe bei der Anfertigung des Manuskriptes „*Simultaneous activation of AhR and HIF-1 $\alpha$  inhibits the p53 and activates ER $\alpha$  signalling in MCF-7 cells*“ danken. Ich möchte mich auch für die herzliche Aufnahme in Winnipeg und in eurer Arbeitsgruppe bedanken. Die Einführung in die Technik der Immunpräzipitation, die Zusammenarbeit mit euch und auch die kleinen Erkundungsreisen in Manitoba haben mir sehr gefallen. In der kurzen Zeit bin ich zu einem richtigen Winnipeg/Kanada-Fan geworden.

Frau Prof. Dr. Katschinski (Zentrum Physiologie und Pathophysiologie, Abteilung Herz- und Kreislaufphysiologie, Georg-August-Universität, Göttingen und Herrn Dr. Stiehl (Physiologisches Institut der Universität Zürich, Schweiz) danke ich für die Bereitstellung der Vektoren pH3SVL, pGL3b(1454-3164)P2P-wt und pGL3b(1454-3164)P2P-mt, die stetige Diskussionsbereitschaft zum Thema HIF-1 $\alpha$ , PHD und Hypoxie sowie für die Hilfe bei der Anfertigung des Manuskriptes „*Significance of PHD2 in the interference between the Aryl hydrocarbon receptor (AhR) and Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )*“.

Herrn PD Dr. Taubert (Institut für Pathologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) danke ich für die vielen Diskussionen rund um das Protein p53 sowie für die Hilfe und guten Ratschläge bei der Anfertigung des Manuskriptes „*Simultaneous activation of AhR and HIF-1 $\alpha$  inhibits the p53 and activates ER $\alpha$  signalling in MCF-7 cells*“.

Herrn PD Dr. Küllertz und Frau Dr. Rau (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) möchte ich für die Bereitstellung der Vektoren NFAT-Luc und pEGFP-C3/NFATc1 sowie für die Diskussion und Hilfe bei der Fertigstellung des Manuskriptes „*Activation of the AhR or stabilization of HIF-1 $\alpha$  activates the NFAT signalling and cell motility of MCF-7 cells*“ danken.

Frau Dr. Kehlen (Probiodrug AG, Halle) danke ich für die Diskussion rund um das Thema Autotaxin und für alle guten Ratschläge.

René Keil Institut möchte ich ganz besonders für die Hilfe bei der Etablierung der siRNA-Experimente, sowie der Calciumphosphat-Kopräzipitation, außerdem für seine ständige Diskussionsbereitschaft und Hilfe danken.

Ich danke der FOR 466/1-1/2, dem DFG-Graduiertenkolleg 416/3-4 und dem Wilhelm-Roux-Programm der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Finanzierung dieser Arbeit.

Schließlich möchte ich mich natürlich auch bei meinen Eltern und meinem Freund René Keil bedanken, die mich immer unterstützt haben und mir immer wieder mit Rat und Tat und vielen aufmunternden Worten zur Seite standen.

**Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Dissertation wurde an keiner anderen Einrichtung vorgelegt.

Halle, den

---

Anja Seifert

# Lebenslauf

## Zur Person:

Anja Seifert  
geboren am 07.02.1980 in Halle/Saale  
deutsche Staatsangehörigkeit  
ledig, keine Kinder

## Schulausbildung:

Sept. 1986 – Jul. 1991      Grundschule KGS W. v. Humboldt in Halle/Saale  
Sept. 1991 – Mai 1998      Gymnasium KGS W. v. Humboldt in Halle/Saale  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Studium:

Okt. 1998 – Jan. 2004      Studium der Biochemie an der „Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg“ in Halle/Saale,  
Abschluss: Diplom-Biochemikerin

Aug. 2001 – Nov. 2001      Studentische Hilfskraft an der Forschungsstelle für  
Enzymologie der Proteinfaltung in Halle/Saale,  
Thema: „Nachweis der in vivo Phosphorylierung von RNase T1 in  
Aspergillus nigra“

Apr. 2003 – Jan. 2004      Diplomarbeit am Institut für Medizinische Immunologie,  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Thema: „Untersuchung von Autotaxin/Lysophospholipase D am  
Schilddrüsenkarzinom“

12.05. – 14.05.2004      Teilnahme am Intensivkurs „Grundlagen der Säuger Zell- und  
Gewebekultur und aktuelle Aspekte der Stammzellforschung“

Mär. 2004 – Jun. 2004      freie Mitarbeiterin bei der Firma „Sensobi Sensoren GmbH“ am  
TGZ in Halle/Saale  
Thema: „Untersuchung der Immunglobuline (IgA, IgG, IgM), des  
PSA und des HbA1c mittels Mikrosensortechnologie und deren  
Evaluierung für in vitro diagnostische Zwecke“

Aug. 2004 – Sept. 2004      studentische Hilfskraft am Institut für Anatomie und Zellbiologie,  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

06.04. – 11.07.2007 Aufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Klonisch am „Department of human Anatomy and Cell Science“ der Medizinischen Fakultät der Universität von Manitoba, Kanada  
Thema: „Charakterisierung der hTert-immortalisierten endometrialen Epithel(EEC) Zelllinie“

### **Gegenwärtige Tätigkeit:**

Seit Nov. 2004 Anfertigung der Promotionsarbeit zum Thema „Untersuchungen zur Interferenz zwischen dem AhR- und dem HIF-1 $\alpha$ -Signalweg sowie deren Auswirkungen auf die p53-, ER $\alpha$ - und NFAT-Signalwege in MCF-7-Zellen“ am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Stipendiat des Graduiertenkollegs: „Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe“

### **Publikationen:**

Kehlen A., Englert N., **Seifert A.**, Klonisch T., Hoang-Vu C., Langner J.

Expression, regulation and function of autotaxin in thyroid carcinoma.

Int. J. Cancer 109 (2004): 833 – 838

**Seifert A.**, Klonisch T., Wulfänger J., Haag F., Dralle H., Langner J., Hoang-Vu C. Kehlen A.

The cellular localization of autotaxin impacts on its biological functions in human thyroid carcinoma cells, Oncology Reports, angenommen

**Seifert A.**, Katschinski D.M., Tonack S., Fischer B., Navarrete Santos A.

Significance of PHD2 in the interference between the Aryl hydrocarbon receptor (AhR) and

Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), Chem. Res. Toxicol (2007), PMID 18072750

**Seifert A.**, Taubert H., Hombach-Klonisch S., Navarrete Santos A., Fischer B.

Simultaneous activation of AhR and HIF-1 $\alpha$  inhibits the p53 and activates ER $\alpha$  signalling in MCF-7 cells, eingereicht bei Mol. Cell. Biology

### **Manuskripte in Vorbereitung:**

**Seifert A.**, Rau S., Küllertz G., Fischer B., Navarrete Santos A.

Activation of the AhR or stabilization of HIF-1 $\alpha$  activates the NFAT signalling and cell motility of MCF-7 cells, Manuskript liegt vor

### **Vorträge**

**Anja Seifert** "Simultaneous exposure to TCDD and hypoxia activate ER $\alpha$  and p53 signalling", DFG-Graduiertenkollegtreffen „Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe“, 25.10.2007, Halle/Saale

**Anja Seifert** „Role of PHD2 in the interference between the AhR and HIF-1 $\alpha$  signalling“ 102. Internationales Treffen der Anatomische Gesellschaft, 30.03.-02.04.2007, Giessen

**Anja Seifert** „Role of PHD2 in the interference between the AhR and HIF-1 $\alpha$  signalling“ DFG-Graduiertenkollegtreffen „Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe“, 10.-11. Nov. 2006, Freyburg/Unstrut

**Anja Seifert** „Effects of TCDD and hypoxia in MCF-7 cells“ DFG-Graduiertenkollegtreffen „Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe“, 03.-05. Nov. 2005, Institut für Pflanzenwissenschaften, Heidelberg

**Anja Seifert** „Differentielle Genexpression in TCDD und Hypoxie stimulierten MCF-7 Zellen“ DFG-Graduiertenkollegtreffen „Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe“, 26.-27. November 2004, Konrad-Adenauer-Stiftung Wendgräben

**Anja Seifert** „Autotaxin beeinflusst differentielle Genexpression im Schilddrüsenkarzinom“, 19. Arbeitstagung für experimentelle Schilddrüsenforschung 11.12. – 13.12.2003, Halle/Saale

### **Abstracts**

**Seifert A.**, Tonack S., Rösler S., Katschinski D.M., Fischer B., Navarrete Santos A., Interference of AhR- and HIF-1 $\alpha$ -mediated transcription pathways, Symposium der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 31. März - 02. April 2005

**Seifert, A.,** Riemann, D., Fischer, B., Navarrete Santos, A., Estrogen modulates effects of TCDD and hypoxia on the functional behaviour of human MCF-7 cells, Abstr. A48, p. 54, Sixth Düsseldorf Symposium on Immunotoxicology, 28. – 30. September, 2005

**Seifert, A.,** Riemann, D., Hombach-Klonisch, S., Fischer, B., Navarrete Santos, A., Exposure to TCDD and hypoxia affects estrogen-mediated cellular functions in MCF-7 cells, Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft, Suppl., Würzburg 2006

**Seifert A.,** Katschinski D.M., Tonack S., Fischer B., Navarrete Santos A.  
Activation of AhR or HIF-1 $\alpha$  regulates PHD2 expression in MCF-7 cells,  
CSHRF Manitoba Poster Competition, Canada, 05. – 07.06.2007

**Seifert A.,** Katschinski D.M., Tonack S., Fischer B., Navarrete Santos A.  
Role of PHD2 in the interference between the Aryl hydrocarbon receptor (AhR) and Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), Canadian Federation of Biological Societies 51th Scientific Conference, Canada, 20. – 23. 06.2007

**Seifert A.,** Rau S., Küllertz G., Fischer B., Navarrete Santos A., Activation of the AhR or stabilization of HIF-1 $\alpha$  activates the NFAT signalling and cell motility of MCF-7 cells, ELSO, Dresden, 01. – 04.09.2007