

**Untersuchung zur PXR-abhängigen Regulation von ETNPPL und
SEC14L4 in menschlichen Leberzellen und des Einflusses von ETNPPL
auf die Phospholipidsynthese**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Katja Löffler

aus Stuttgart

Tübingen

2021

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

14. Dezember 2021

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Matthias Schwab

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Ruth

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Zusammenfassung.....	XII
Abstract.....	XIV
1 Einleitung.....	1
1.1 Pregnan X Rezeptor.....	1
1.2 PXR im Xenobiotika Metabolismus.....	4
1.3 Die Rolle von PXR im Endobiotika Metabolismus.....	5
1.4 Ethanolamin-Phosphat Phospho-Lyase.....	8
1.4.1 Phosphatidylethanolamin.....	10
1.4.2 Der Kennedy-Pathway.....	11
1.5 SEC14-ähnliches Protein 4/tocopherol assoziiertes Protein 3.....	15
1.6 Ziel der Arbeit.....	18
2 Material.....	20
2.1 Chemikalien & Reagenzien.....	20
2.2 Medien für Zellkultur und Bakterienkultivierung.....	27
2.3 Plasmide.....	29
2.4 Primer.....	32
2.5 Restriktionsenzyme.....	37
2.6 Antikörper.....	38
2.7 Genexpressionsassays.....	39
2.8 Kits.....	39
2.9 Puffer.....	40
2.10 Geräte & sonstige Materialien.....	43
3 Methoden.....	46
3.1 Zelllinie.....	46
3.2 Zellkultur.....	46
3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	46
3.4 Primäre Hepatozyten.....	47
3.5 Quantitative real time-PCR (Fluidigm).....	48
3.5.1 RNA-Isolierung.....	48
3.5.2 cDNA Synthese.....	49

3.5.3	pre-Amplifikation.....	49
3.5.4	Fluidigm FLEXsix IFC TaqMan Standard Gene Expression Assay	50
3.6	Proteinpräparation und Analyse	51
3.7	<i>In-silico</i> Analyse der Kernrezeptor-Bindemotive.....	53
3.8	Polymerase-Ketten-Reaktion zur Klonierung der Elemente	53
3.9	Agarose-Gel-Elektrophorese zur Überprüfung und Aufreinigung der Konstrukte.....	54
3.10	Restriktionsverdau	55
3.11	Vektorpräparation	55
3.12	Agarose-Gel Aufreinigung	55
3.13	Ligation der gesuchten Inserts mit dem Leervektor	56
3.14	Transformation kompetenter Zellen	56
3.15	DNA-Präparation	57
3.16	Sequenzierung der verschiedenen Klone zur Sequenzüberprüfung	58
3.17	Midi-Plasmid-Präparation	60
3.18	Reportergen Assay zur Untersuchung der Aktivität der Elemente	61
3.18.1	Transiente Transfektion von HepG2-Zellen mit JetPRIME	61
3.18.2	Leuchtkäfer/Renilla-Luciferase-Assays.....	61
3.19	Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) der potenziellen PXR-Bindestellen aus den Rifampicin-induzierten Konstrukten	62
3.19.1	Hybridisierung der einzelsträngigen Gel-Shift-Oligonukleotide.....	62
3.19.2	<i>In vitro</i> Transkription/Translation zur Proteinbiosynthese	62
3.19.3	Radioaktive Markierung der Hybridisierten Doppelstränge & Reinigung.....	63
3.19.4	Gel-Shift-Assay mit in vitro synthetisiertem Protein.....	64
3.19.5	Kompetitions-Gel-Shift Assay	65
3.20	Mutagenese der Plasmide.....	66
3.21	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	66
3.21.1	Zellgewinnung und DNA-Protein-Quervernetzung	67
3.21.2	Zelllyse und Chromatinfragmentierung	67
3.21.3	Immunpräzipitation.....	68
3.21.4	DNA-Isolierung und lösen der DNA-Protein-Quervernetzung	69
3.21.5	Auswertung der Chromatin-Immunpräzipitation.....	70
3.22	Quantifizierung der Metabolite des CDP-Ethanolamin Syntheseweges mittels LC-ESI-MS/MS	71
3.22.1	Quantifizierung von Phosphoethanolamin	72
3.22.2	Bestimmung der Phosphatidylethanolamine.....	74

3.22.3	DNA-Quantifizierung	77
3.23	Statistische Analyse	78
4	Ergebnisse.....	79
4.1	Induktion der ETNPPL Expression durch PXR Aktivierung auf RNA Ebene	79
4.2	Induktion der ETNPPL Expression durch PXR Aktivierung auf Protein Ebene	80
4.3	Bindung von PXR an spezifische Motive von ETNPPL oberhalb des Promoters	82
4.3.1	Identifizierung der regulatorischen Regionen von ETNPPL mittels Transfektion	82
4.3.2	Identifizierung der PXR-Bindestellen in R1- und R2-Regionen von ETNPPL mittels EMSA.	85
4.3.3	Untersuchung der identifizierten regulatorischen Regionen von ETNPPL mittels Chromatin Immunpräzipitation	87
4.3.4	Untersuchung der identifizierten regulatorischen Regionen von ETNPPL mittels Transfektion.....	89
4.4	Einfluss von PXR und LXR auf die Genexpression der Kennedy-Pathway Gene	92
4.5	PXR Aktivierung führt zu einer Reduktion der Phosphoethanolaminkonzentration in primären Hepatozyten	96
4.6	Induktion der SEC14L4 Expression durch PXR Aktivierung auf RNA Ebene.....	100
4.7	Bindung von PXR an spezifische Motive von SEC14L4 oberhalb und unterhalb des Promoters	101
5	Diskussion.....	107
5.1	Regulation von ETNPPL in Leberzellen	108
5.2	Metabolische Konsequenzen der PXR-abhängigen Regulation von ETNPPL	111
5.3	Die Regulation von SEC14L4 in Leberzellen	120
6	Literaturverzeichnis.....	123
	Erklärung über gemeinschaftliche Arbeiten.....	135
	Danksagung	136

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Allgemeiner Strukturaufbau der Kernrezeptoren.....	1
Abbildung 2: Beispielhafte Darstellung der Erkennungssequenzen für die Bindung des Kernrezeptors nach Ligandenbindung.....	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung der PXR-abhängigen Regulierung der Lipidhomöostase.....	6
Abbildung 4: ETNPPL katalysiert die irreversible Reaktion von Phosphoethanolamin zu Acetaldehyd und Ammoniak unter Bildung von Phosphat.	10
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Kennedy-Pathway (CDP-Ethanolamin und CDP-Cholin Syntheseweg).....	12
Abbildung 6: Schematische Darstellung des CDP-Cholin Synthesewegs in der Hefe, indem SEC14p die Phosphatidylcholin (PC)-Synthese durch Inhibition des CT und Aktivierung von NTE1 reguliert.....	16
Abbildung 7: Die Induktion der Genexpression von ETNPPL durch Rifampicin ist PXR-abhängig.	79
Abbildung 8: Die Proteinkonzentration von ETNPPL ist nach PXR-Aktivierung erhöht.	81
Abbildung 9: Identifizierung von zwei potenziellen Regionen oberhalb des ersten Exons von ETNPPL, die PXR-abhängig reguliert werden.	83
Abbildung 10: Auszug des auf Chromatin 4 liegenden ETNPPL (AGXT2L1) aus dem UCSC Genome Browser.....	84
Abbildung 11: Untersuchung der PXR-Bindestellen der R1-Region von ETNPPL mittels EMSA.	85
Abbildung 12: Untersuchung der PXR-Bindestellen der R2-Region von ETNPPL mittels EMSA.	86
Abbildung 13: PXR bindet an die regulatorische Region R1 von ETNPPL.	88
Abbildung 14: Darstellung der ETNPPL Enhancerregionen vor der ETNPPL eigenen Promotorregion und Mutation der PXR Bindemotive aus der R1- und R2-Region.	90
Abbildung 15: Einfluss von PXR und/oder LXR auf die Genexpression einiger Kennedy-Pathway Gene.	95
Abbildung 16: LXR-abhängige Regulation der kombinierten ETNPPL Enhancerregion R1-R2.....	96
Abbildung 17: Beispielhafte MS-Peak eines Leerwerts, des ersten Eichpunkts und des Phosphoethanolamin mit jeweiligem Internen Standard (unten) nach der Messung mittels LC-ESI-MS/MS.	97
Abbildung 18: Rifampicin-induzierte Reduktion der Phosphoethanolaminkonzentration und der Peakflächensumme der PEs und LPEs.....	98
Abbildung 19: Die Induktion der Genexpression von SEC14L4 durch Rifampicin ist PXR-abhängig.....	100
Abbildung 20: Identifizierung von der potenziellen Region 3' unterhalb des ersten Exons von SEC14L4, die PXR-abhängig reguliert werden.....	101
Abbildung 21: Auszug des auf Chromatin 22 liegenden SEC14L4 aus dem UCSC Genome Browser. ...	103
Abbildung 22: Untersuchung der PXR-Bindestellen der SE5-Region von SEC14L4 mittels EMSA.	104

Abbildung 23: Identifizierung von potenziellen Regionen 5' oberhalb des ersten Exons von SEC14L4, die PXR-abhängig reguliert werden. 105

Abbildung 24: Schema des CDP-Ethanolamin Syntheseweg und des hypothetischen Einflusses der PXR-Aktivierung auf die PE-Synthese. 118

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: HPLC-Gradient für die Bestimmung von Phosphoethanolamin.....	73
Tabelle 2: MRM-Übergänge und MS-Parameter für die Bestimmung von Phosphoethanolamin	73
Tabelle 3: HPLC-Gradient für die Bestimmung der Phosphatidylethanolamine	74
Tabelle 4: Auflistung der Massen und Summenformeln des als Internen Standard verwendeten LPE 17:1 und PE 34:0.....	75
Tabelle 5: Auflistung aller gemessenen PE-Spezies mit den dazugehörigen Massen und Summenformeln.....	76
Tabelle 6: Auflistung der gefundenen LPE-Spezies mit den dazugehörigen Massen und Summenformeln.....	77
Tabelle 7: Detaillierte Beschreibung der gefundenen PXR-Bindemotiven für die R1- und R2-Region...	84
Tabelle 8 Auflistung der gemessenen PE- und LPE-Spezies (+) im direkten Vergleich zwischen Rifampicin- (RIF) und DMSO-Behandlung, sowie mit und ohne d ₄ -Markierung. (-) symbolisiert die Spezies, die mit dieser Behandlung nicht messbar war.	99
Tabelle 9: Detaillierte Beschreibung der gefundenen PXR-Bindemotive für die SE5-Region 3' unterhalb des ersten Exons des SEC14L4 Gens.	103
Tabelle 10: Detaillierte Beschreibung der identifizierten PXR-Bindemotive für die S4-Region 5' oberhalb des ersten Exons des SEC14L4 Gens.....	106

Abkürzungsverzeichnis

AAG	Alkylacylglycerol
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ACN	Acetonitril
AGXT2L1	<i>Alanin-glyoxylat aminotransferase 2-like protein 1</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variances/Varianzenanalyse</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	breast cancer resistance protein
CaCl ₂	Calciumchlorid
CDP	Cytidindiphosphat
CEPT	1,2-diacylglycerol cholin/ethanolaminphosphotransferase
ChIP	Chromatin Immunpräzipitation
CK	Cholinkinase
CPT	1,2-diacylglycerol cholinphosphotransferase
CPT1A	carnitine palmitoyltransferase 1A
CREB	cAMP-response element-binding proteins
CT	CTP:phosphocholin cytidyltransferase (PCYT1A/B)
CTP	Cytidintriphosphat
CTR	Kontrolle
CYP	Zytochrom P450 Enzyme
CYP27A1	sterol 27-hydroxylase
CYP3A4	Cytochrom P450 3A4
DAG	Diacylglycerol
DBD	DNA-Bindedomäne
ddH ₂ O	deionisiertes demineralisiertes Wasser
DDI	drug-drug Interaktionen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	Direct repeat
DTT	Dithiothreitol

EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate
EGR1	early growth response protein 1
EK	Ethanolaminkinase (ETNK1, ETNK2)
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay/Elektrophoretischer Mobilitätsverschiebungstest
EPT	1,2-diacylglycerol ethanolaminephosphotransferase (EPT1/SELENOI)
ER	everted repeat
ET	CTP:phosphoethanolamin cytidyltransferase (PCYT2)
ETNK1	Ethanolaminkinase 1
ETNK2	Ethanolaminkinase 2
ETNPPL	Ethanolamin-Phosphat Phospho-Lyase
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
G6Pase	Glukose-6-Phosphatase
GOLD	Golgi Dynamics Domäne
GPC	Glycerophosphocholin
GST	glutathion S-transferase
H3K4m1	Monomethylierung des Lysin 4 von Histon 3
H3K4m2	Dimethylierung des Lysin 4 von Histon 3
H3K27ac	Acetylierung des Lysin 27 von Histon 3
HCC	hepatocelluläres Karzinom
HCl	Hydrochlorid/Salzsäure
HEK	humane embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMGCS2	3-hydroxy-3-methyl-glutrate-CoA synthase 2
HNF4 α	hepatocyte nuclear factor 4 α
hTAP	humanes Tocopherol-assoziiertes Protein
IP	Immunopräzipitation
IR	indirect repeat
IRS	Insulin response sequence
ISTD	Interner Standard
ITS-G	Insulin-Transferrin-Selenium-G

KCl	Kaliumchlorid
KLD	Enzym-Mix aus Kinase, Ligase, DpnI
LBD	Liganden-Bindedomäne
LC-ESI-MS/MS	Flüssigchromatographie-Elektronensprayionisierungs-Tandem Massenspektrometrie
LPE	Lyso-Phosphatidylethanolamin
LXR α/β	Leber X Rezeptor α/β
m	Mutante/mutiert?
MAM	Mitochondrien-assoziierte Membran des ER
MDR1	<i>multidrug resistance 1</i>
MEM	<i>Minimum Essential Media</i>
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MOPS	3-(N-Morpholino)propan-sulfonsäure
MRP2	<i>multidrug resistance associated protein 2</i>
Na	Natrium
NaAC	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NAFLD	nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis
NEB	New England Biolabs
NF κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NR	Kernrezeptor (<i>nuclear receptor</i>)
OATP	organic anion transporting polypeptide
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PEMT	Phosphatidylethanolamin N-methyltransferase
PEPCK1	phosphoenolpyruvat carboxykinase 1

PGC-1 α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α</i>
PI	Phosphatidylinositol
PLP	Pyridoxalphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
PSD	Phosphatidylserin decarboxylase
PSS1/PSS2	Phosphatidylserin synthase
PXR	Pregnan X Rezeptor
siPXR	PXR Knockdown durch small interfering RNA (siRNA)
RIF	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
RXR	Retinoid X Rezeptor
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SEC14L2-4	Sec14-ähnliches Protein 2-4
SMPDL3A	<i>Spingomyelin phosphodiesterase acid-like 3A</i>
SPTLC3	<i>Serine Palmitoyltransferase Long Chain Base Subunit 3</i>
SREBP-1c	<i>sterol regulatory element-binding protein 1c</i>
SULT	sulfotransferase
TC	Tissue culture/Zellkultur
TEMED	Tetramethylethyldiamin
THRSP	<i>thyroid hormone-responsive spot 14 protein</i>
UCSC	<i>University of California, Santa Cruz</i>
UGT	UDP-glucuronosyl transferase
UPR	<i>unfolded protein response</i>
wt	Wildtyp
Anti-FLAG	ANTI-FLAG clone M2
Anti-Mouse	Mouse IgG
bp	Basenpaare
d ₄	4-fach deuteriert
μ g	Mikrogramm

μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
g	Gramm
H	Stunde
kDa	Kilodalton
min	Minuten
mL	Milliliter
mM	Millimolar
nM	Nanomolar
pmol	Picomolar
rpm/upm	<i>rounds per minute</i> /Umdrehungen pro Minute
sek	Sekunden
TPM	<i>transcripts per million</i>
U/ μL	Units pro Mikroliter
V	Volt

Zusammenfassung

Der Pregnan X Rezeptor (PXR) beeinflusst als Liganden-abhängiger Kernrezeptor hauptsächlich die Verstoffwechslung und Eliminierung von Fremdstoffen durch Regulation der Gene, die für arzneimittelabbauende Enzyme und Medikamententransporter kodieren. Außerdem ist bekannt, dass PXR auch an der Regulation des Glukosemetabolismus beteiligt ist und durch Induktion der *de novo* Lipogenese Einfluss auf den Lipidmetabolismus hat.

Während die Regulation des Fremdstoff-, Glukose- und Lipidmetabolismus durch PXR bereits ausführlich untersucht wurde, gibt es, wie Genom-weite Genexpressionsanalysen nahelegen, noch weitere Synthese- und Signalwege, die durch PXR reguliert werden könnten. Diese Arbeit fokussiert sich auf die Gene ETNPPL und SEC14L4, deren Expression in primären humanen Hepatozyten durch Behandlung mit PXR Liganden induziert wird.

Während für ETNPPL bekannt ist, dass es die irreversible und höchst spezifische Reaktion von Phosphoethanolamin zu Acetaldehyd, Ammoniak und Phosphat katalysiert, ist für das SEC14L4 die genaue Funktion noch nicht bekannt. Da das Phosphoethanolamin der Vorläufer für das Phosphatidylethanolamin ist, eines der vier hauptsächlich Membranlipide, kann vermutet werden, dass eine PXR-abhängige Regulation der ETNPPL Expression Einfluss auf die Lipidsynthese durch den CDP-Ethanolamin Syntheseweg hat.

Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Mechanismen der Regulierung von ETNPPL und SEC14L4 durch PXR aufzuklären. Weiterhin galt es die funktionelle Bedeutung dieser Regulation für die Synthese von Phosphatidylethanolamin zu untersuchen.

Durch Kombination von siRNA-vermitteltem Knockdown und quantitativer Echtzeit PCR konnte gezeigt werden, dass beide Gene PXR-abhängig reguliert werden. Die Regulation der ETNPPL mRNA durch PXR erscheint funktionell relevant zu sein, da auch die Proteinexpression durch PXR-Aktivierung induziert wird.

Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen wurde eine *in silico* Analyse der beiden Gene auf das Vorhandensein potenzieller PXR-Bindestellen durchgeführt.

Im ETNPPL-Gen wurden zwei Regionen mit potenziellen PXR-Bindestellen als PXR-abhängige Enhancer identifiziert (R1- und R2-Region). Die *in vitro* Bindung von PXR an die entsprechenden Motive der Enhancerregionen konnte mittels EMSA bestätigt und die *in vivo* Bindung der R1-Region mittels Chromatin Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Durch

die Mutationsanalyse der Bindestellen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung durch PXR in jedem Enhancer von mehreren Bindemotiven abhängt.

Für das SEC14L4-Gen konnten mindestens zwei Regionen als potenziell PXR-abhängige Enhancer identifiziert werden (SE5- und S4-Region). Für die SE5-Enhancerregion wurde mittels EMSA die *in vitro* Bindung von PXR an die entsprechenden Motive bestätigt.

Auch die Regulierung durch den Leber X Rezeptor (LXR), ebenfalls ein Kernrezeptor, der in der Leber exprimiert wird und hauptsächlich den hepatischen Triglyzerid- und Cholesterolmetabolismus reguliert, wurde für die Gene des CDP-Ethanolamin Synthesewegs, sowie für ETNPPL und SEC14L4 untersucht. Eine Regulierung durch PXR und LXR oder PXR-spezifisch, konnte nur für ETNPPL, SEC14L4 und die Ethanolaminkinase 2 (ETNK2) nachgewiesen werden.

Die Bedeutung der PXR-Aktivierung für den Phosphoethanolaminspiegel und die Synthese von Phosphatidylethanolamin wurde mittels LC-ESI-MS/MS untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Phosphoethanolaminkonzentration in primären humanen Hepatozyten nach PXR-Aktivierung deutlich reduziert war. Weiterhin konnte in einem Pilotversuch mit Isotopenmarkiertem Ethanolamin eine Reduktion der neusynthetisierten Phosphatidylethanolaminspezies nach PXR-Aktivierung festgestellt werden.

Durch Induktion von ETNPPL und eventuell auch Hemmung der ETNK2 Expression in der Leber scheint PXR die Neusynthese von PE negativ zu beeinflussen. Dadurch kann es zu einem veränderten Phosphatidylcholin/-ethanolamin -Verhältnis in der Zellmembran kommen, was zu einem Verlust der Membranintegrität und erhöhter Membranpermeabilität führen könnte oder es hat einen protektiven Effekt, in dem die erhöhte ETNPPL Expression die Zelle vor zu hohen Phosphoethanolaminkonzentrationen schützt.

Abstract

As a ligand-dependent nuclear receptor, the pregnane X receptor (PXR) mainly influences the metabolism and elimination of xenobiotics by regulating genes encoding drug-metabolizing enzymes and drug transporters. In addition, PXR is also known to be involved in the regulation of glucose metabolism and to influence lipid metabolism through induction of *de novo* lipogenesis.

While the regulation of xenobiotic, glucose, and lipid metabolism by PXR has been extensively studied, genome-wide gene expression analyses suggest that there are other synthetic and signaling pathways that may be regulated by PXR. This work focuses on the ETNPPL and SEC14L4 genes, whose expression is induced in primary human hepatocytes by treatment with PXR ligands.

Whereas ETNPPL is known to catalyze the irreversible and highly specific reaction of phosphoethanolamine to acetaldehyde, ammonia, and phosphate, the exact function is not yet known for SEC14L4. Since phosphoethanolamine is the precursor for phosphatidylethanolamine, one of the four major membrane lipids, it can be speculated that PXR-dependent regulation of ETNPPL expression influences lipid synthesis through the CDP-ethanolamine pathway.

The aim of this work was to elucidate the molecular mechanisms of regulation of ETNPPL and SEC14L4 by PXR. Furthermore, the functional significance of this regulation for the synthesis of phosphatidylethanolamine should be investigated.

By combining siRNA-mediated knockdown and quantitative real-time PCR, both genes were shown to be regulated in a PXR-dependent manner. Regulation of ETNPPL mRNA by PXR appears to be functionally relevant, as protein expression was also induced by PXR activation. To elucidate the molecular mechanisms, an *in silico* analysis of the two genes was performed for the presence of potential PXR binding sites.

In the ETNPPL gene, two regions with potential PXR binding sites were identified as PXR-dependent enhancers (R1 and R2 region). *In vitro* binding of PXR to the corresponding motifs of the enhancer regions was confirmed by EMSA, and *in vivo* binding to the R1 region was detected by chromatin immunoprecipitation. Mutational analysis of the binding sites demonstrated that activation by PXR in each enhancer depends on multiple binding motifs.

For the SEC14L4 gene, at least two regions were identified as potential PXR-dependent enhancers (SE5 and S4 region). For the SE5 enhancer region, *in vitro* binding of PXR to the corresponding motifs was confirmed by EMSA.

Regulation by the liver X receptor (LXR), also a nuclear receptor expressed in the liver and mainly regulating hepatic triglyceride and cholesterol metabolism, was also investigated for the genes of the CDP-ethanolamine pathway, as well as for ETNPPL and SEC14L4. Regulation by PXR and LXR, or specifically by PXR, was detected only for ETNPPL, SEC14L4, and ethanolamine kinase 2 (ETNK2).

The significance of PXR activation for phosphoethanolamine levels and the synthesis of phosphatidylethanolamine was investigated by LC-ESI-MS/MS. It was shown that the phosphoethanolamine concentration in primary human hepatocytes was significantly reduced after PXR activation. Furthermore, a pilot experiment with isotope-labeled ethanolamine showed a reduction in newly synthesized phosphatidylethanolamine levels after PXR activation.

By inducing ETNPPL and possibly also inhibiting ETNK2 expression in the liver, PXR appears to negatively affect the *de novo* synthesis of PE. This may result in an altered phosphatidylcholine/-ethanolamine ratio in the cell membrane, which could lead to loss of membrane integrity and increased membrane permeability, or it may have a protective effect in which increased ETNPPL expression protects the cell from excessive phosphoethanolamine concentration.

1 Einleitung

1.1 Pregnan X Rezeptor

Als metabolisch aktives Organ ist die Leber an der Biotransformation von endogenen und exogenen Substanzen beteiligt. Die Eliminierung und Metabolisierung von toxischen Chemikalien, lipophilen Hormonen, Vitaminen, endogenen und exogenen Lipiden und xenobiotischen Substanzen, z.B. Medikamenten, stellt einen wichtigen Teil des Verteidigungssystems des menschlichen Körpers dar. Die Genexpression der hieran beteiligten Enzyme und Transporter wird im Wesentlichen von einigen Kernrezeptoren (*nuclear receptor*, NRs) reguliert, die als Sensoren für Fremdstoffe, wie toxische Chemikalien, fungieren (Mackowiak & Wang, 2016). Diese Kernrezeptoren bilden eine Familie aus phylogenetisch-verwandten, sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren, welche im Menschen von 48 Genen kodiert werden. Anhand ihrer molekularen Phylogenie können diese Kernrezeptoren in die Subfamilien 0 bis 6 unterteilt werden, wobei zum Beispiel die Subfamilie 1 Kernrezeptoren enthält, die mit RXR Heterodimere bilden können (Robinson-Rechavi et al., 2003; Pawlak et al., 2012). Kernrezeptoren setzen sich aus verschiedenen Domänen zusammen, wie in Abbildung 1 gezeigt wird.

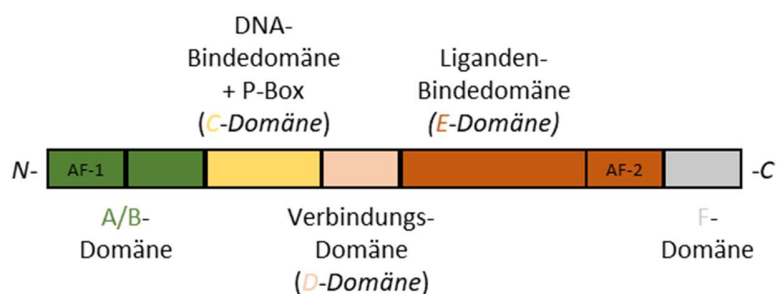


Abbildung 1: Allgemeiner Strukturaufbau der Kernrezeptoren.

Die N-terminale, stark variable A/B-Domäne enthält mindestens eine konstitutionell aktive Transaktivierungsfunktion (AF-1). Gefolgt wird sie von der DNA-Bindedomäne, die eine P-Box enthält. Über die Verbindungsdomäne ist die DBD mit der Ligandenbindedomäne verbunden, die ebenfalls eine Transaktivierungsregion (AF-2) enthält. Manche Kernrezeptoren enthalten außerdem eine sehr variable F-Domäne am C-Terminus., deren Funktion noch unbekannt ist.

Alle Rezeptoren besitzen eine sehr variable Region am N-Terminus, die als A/B-Domäne bekannt ist und mindestens eine konstitutionell aktive Transaktivierungsfunktion (AF-1) enthält. Die am stärksten konservierte Domäne ist die DNA-Bindedomäne (DBD). Die Hauptfunktion der DBD ist es, spezifische DNA-Sequenzen zu erkennen und zu binden. Sie besteht aus zwei sogenannten *zinc fingers*, jeweils gefolgt von einer amphipathischen α -Helix. Im ersten Finger befindet sich die sogenannte P-Box, ein kurzes Motiv aus drei Aminosäuren, das für die direkte DNA-Interaktion und die DNA-Bindungsspezifität an der spezifischen DNA-Erkennungssequenz verantwortlich ist. Der zweite Finger unterstützt die Dimerisierung der zwei Monomere, die an die DNA gebunden sind, durch Bereitstellung von Phosphatkontakten zur DNA (Nelson et al., 1993; Smit-McBride & Privalsky, 1994; Pawlak et al., 2012). Diese und weitere Sequenzen der DBD sind auch an der Bildung von Homo- oder Heterodimeren beteiligt. Die DBD ist über eine Verbindungsregion mit der Ligandenbindedomäne (LBD) verbunden. Die LBD ist eine multifunktionelle Domäne, die neben der Ligandenbindetasche auch ein Dimerisierungsmotiv und ein Kernlokalisierungssignal umfasst. Die Ligandenbindetasche unterscheidet sich von Kernrezeptor zu Kernrezeptor in Volumen und Struktur. Viele Kernrezeptoren konkurrieren um dieselben oder ähnliche Liganden, wodurch es zu einem Crosstalk zwischen den Kernrezeptoren kommen kann, was zu einer vielseitigen Regulierung, von zum Beispiel der xenobiotischen Entgiftung, führt. Durch Bindung eines Liganden in die Ligandenbindetasche kommt es zu einer Konformitätsänderung des Kernrezeptors, welche die Bindung von Ko-Aktivatoren ermöglicht und somit zur Kernlokalisierung und zur Aktivierung des Kernrezeptors führt (Mackowiak & Wang, 2016). Am C-Terminus befindet sich meistens noch die F-Domäne, mit sehr variabler Sequenz und über deren Struktur und Funktion wenig bekannt ist.

Einer der wichtigsten Kernrezeptoren für die Regulation der Entgiftung ist der Pregnane X Rezeptor (PXR). Er gehört zur Kernrezeptor 1 Subfamilie und wird durch NR1I2 codiert (Cave et al., 2016). Die LBD ist sehr groß (1200-1600 Å³) und flexibel, die Ligandenbindetasche sehr hydrophob, weshalb PXR eine Vielzahl verschiedener Substanzen unterschiedlicher Größe und Struktur binden kann (Buchman et al., 2018; Cave et al., 2016; Mackowiak & Wang, 2016; Oladimeji et al., 2016). Nach der Aktivierung wandert PXR vom Cytoplasma in den Nukleus und bindet dort als Heterodimer mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR) an bestimmte

Erkennungssequenzen in den regulatorischen Regionen seiner Zielgene. Diese Erkennungssequenzen bestehen meist aus 1-2 hexamerischen *half-site* Motiven, als *direct* (DR), *indirect* (IR) oder *everted* (ER) *repeats* angeordnet (Pawlak et al., 2012), wie in Abbildung 2 zu sehen. Die Erkennungssequenzen für PXR sind DR3, DR4, ER6, ER8 oder IR0 und enthalten das *half-site* Motiv (A/G)G(G/T)TCA.

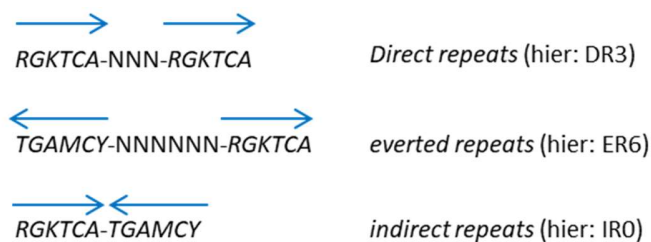


Abbildung 2: Beispielhafte Darstellung der Erkennungssequenzen für die Bindung des Kernrezeptors nach Ligandenbindung.

R steht für A oder G und K steht für G oder T, während Y für T oder C und M für C oder A steht.

N kann durch eine beliebige Aminosäure ersetzt werden und die Anzahl variiert. PXR bindet insbesondere an die Erkennungssequenzen DR3, DR4, ER6, ER8 und IR0 mit dem Motiv RGKTCA.

Durch die direkte Bindung an die DNA reguliert PXR die Transkription dieser Gene. Eine Regulierung der Gentranskription ist aber auch indirekt, ohne direkte Bindung an die DNA, über Protein-Protein-Interaktionen möglich. Dabei wird PXR selbst durch direkte Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren reguliert, in der Regel inaktiviert und somit die Gentranskription beeinflusst (Ihunnah et al., 2011; Pawlak et al., 2012; Oladimeji et al., 2016). PXR wird am stärksten in der Leber und im Darm exprimiert, wo er nach erfolgter Aktivierung durch Ligandenbindung die Expression von Genen, welche für Fremdstoff-metabolisierende Enzyme (z.B. Phase I und Phase II Enzyme wie Zytochrome P450 Enzyme (*cytochrome P450*, CYPs) oder UDP-glucuronosyl transferase (UGT)) und Transporter (z.B. ABC Transporter wie *multidrug resistance 1* (MDR1) oder *organic anion transporting polypeptide 1B1* (OATP1B1)) kodieren, induziert. Weiterhin spielt PXR eine wichtige Rolle im Glukose- und Lipidmetabolismus, in der Entgiftung von Gallensäuren und teilweise auch bei Entzündungsreaktionen (Ihunnah et al., 2011).

1.2 PXR im Xenobiotika Metabolismus

Für die physiologische Funktion des Organismus ist es essenziell potenziell toxische exogene und endogene Verbindungen zu metabolisieren. PXR beeinflusst diesen Prozess vor allem durch Induktion der Genexpression von Zytochrom P450 (CYP) Enzymen. Phase I Enzyme, wie zum Beispiel CYP3A4, katalysieren den ersten Schritt der Entgiftung von aliphatischen oder lipophilen Verbindungen, in dem sie diese hydroxylieren oder oxidieren. Dadurch werden die Verbindungen für die Phase II Enzyme vorbereitet. Durch die Phase II Enzyme werden polare Moleküle, wie Glucuronsäure, Sulfat oder Glutathion, an die ursprünglichen Stoffe oder deren Phase I Metabolite angehängt, wodurch sie zu wasserlöslichen, nicht toxischen, Metaboliten werden, die durch die Galle oder mit dem Urin ausgeschieden werden können. Hier reguliert PXR die Expression von Phase II Enzymen wie UGTs, Sulfotransferasen oder Glutathion S-transferasen (Ihunnah et al., 2011; H. Wang & LeCluyse, 2003).

Die Eliminierung und Absorption der Xenobiotika erfolgt durch eine Vielzahl an Transportern, die mit den Phase I und II Enzymen zusammenarbeiten. Dabei reguliert PXR vor allem die Expression von *ATP binding cassette* (ABC) Proteinen, die für den zellulären Efflux von Medikamenten verantwortlich sind. Dazu gehört das MDR1, kodiert vom *ABCB1*-Gen, sowie die *multidrug resistance associated proteins* (z.B. MRP2, MRP3) und das *breast cancer resistance protein* (BCRP). Ebenfalls reguliert PXR die Gene OATP1A2/SLCO1A2, OATP1B1/SLCO1B1 und OATP1B3/SLCO1B3, die zur OATP Familie gehören und die für die Regulierung der Aufnahme von Medikamenten und Endobiotika in die Leber verantwortlich sind (Ihunnah et al., 2011).

Da PXR auf Änderungen in der chemischen Umgebung der Zelle sofort mit der Induktion von zum Beispiel der xenobiotischen Biotransformation und dem Transport reagiert, spielt PXR eine wichtige Rolle bei der Entstehung von klinisch relevanten Arzneimittelinteraktionen (*drug-drug interactions*, DDIs). Insbesondere die CYP3A Subfamilie, die auch im Phase I Metabolismus eine Rolle spielt und durch PXR reguliert wird, ist für den Stoffwechsel vieler Medikamente verantwortlich. Dadurch kann es durch PXR-Aktivierung zu einem beschleunigten Arzneimittelstoffwechsel oder verringerter Verfügbarkeit eines Medikaments

kommen, was unerwünschte Effekte zur Folge haben kann (Ihunnah et al., 2011; Hakkola et al., 2016).

1.3 Die Rolle von PXR im Endobiotika Metabolismus

Neben der Rolle, die PXR bei der Verstoffwechslung von Xenobiotika spielt, ist er auch am Glukose- und Lipidmetabolismus, an der Steroidhomöostase, der Gallensäure und Bilirubin Detoxifikation, am Vitaminmetabolismus und an der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt (Ihunnah et al., 2011).

Im Glukosemetabolismus beeinflusst PXR die Glukoneogenese. Zum einen bildet PXR mit dem *cAMP-response element-binding protein* (CREB) einen Komplex und verhindert so dessen Bindung an den Glukose-6-Phosphatase (G6Pase) Genpromotor, wodurch die Glukoneogenese unterdrückt wird. Weiterhin interagiert PXR mit dem *forkhead box protein O1* (FOXO1). Hierdurch wird die Bindung von FOXO1 an die *Insulin response sequence* (IRS) unterbunden, was zur Hemmung der Genexpression der G6Pase und der Phosphoenolpyruvat carboxykinase 1 (PEPCK1) führt und auf diesem Weg auch die Glukoneogenese reduziert. Außerdem wurde gezeigt, dass PXR mit dem *hepatocyte nuclear factor 4 α* (HNF4 α) um den Ko-Aktivator *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α* (PGC-1 α) konkurriert, was ebenfalls zur Suppression der Glukoneogenese führt (Ihunnah et al., 2011; Hakkola et al., 2016).

Die Lipidhomöostase beruht auf dem Gleichgewicht zwischen Lipidaufnahme und der Synthese. Dazu gehören auch der Lipidkatabolismus und die Sekretion. Wenn die Konzentration an Glukose und Fettsäuren den Körperbedarf überschreitet, werden diese als Triglyzeride in Form von Fetttröpfchen (*lipid droplets*) in der Leber gespeichert. Die solcherart gespeicherten Fettsäuren können bei Bedarf durch β -Oxidation und Ketogenese wieder für die Energiezufuhr bereitgestellt werden (Ihunnah et al., 2011).

Durch PXR Aktivierung kommt es zur Repression der β -Oxidation und Induktion der Lipogenese, was die Induktion der Hepatosteatose zur Folge hat. Da die betroffenen Enzyme sich spezie-spezifisch unterscheiden, wurde hier der Fokus auf die Abläufe in humanen Zellmodellen gelegt. Die Induktion der Hepatosteatose wird hauptsächlich durch die Bereitstellung von Acetyl-CoA für die Lipogenese und Induktion spezifischer Enzyme, aber auch durch die Unterdrückung der β -Oxidation in Mitochondrien ausgelöst (Hakkola et al., 2016). Der hepatische Citrat-Transporter SLC13A5 wird direkt durch PXR Aktivierung hochreguliert, wodurch Citrat in die Zelle gelangt (L. Li et al., 2015). Auch diverse Gene der Lipogenese, wie *ACL*, *ACC1*, *FAS*, *SCD1* und *ELOVL6*, deren Enzyme die *de novo* Lipogenese regulieren, werden durch PXR Aktivierung beeinflusst (Hakkola et al., 2016), was in Abbildung 3 schematisch dargestellt ist.

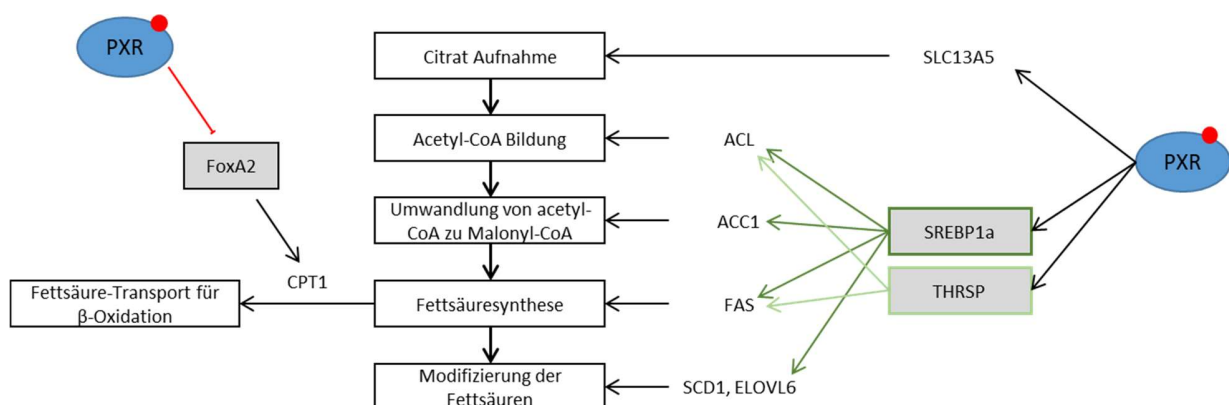


Abbildung 3: Schematische Darstellung der PXR-abhängigen Regulierung der Lipidhomöostase.

Durch PXR Aktivierung wird die Expression des Citrat-Transporters SLC13A5 induziert, der für die Citrat Aufnahme in die Zelle verantwortlich ist. Außerdem induziert PXR SREBP1a, dass die Enzyme ACL, ACC1, FAS, SCD1 und ELOVL6 aktiviert, und das THRSP, dass die Enzyme ACL und FAS aktiviert. Diese Enzyme sind an der *de novo* Lipogenese beteiligt. Auf der anderen Seite scheint PXR den Fettsäure-Transport in die Mitochondrien, der für die β -Oxidation essenziell ist, zu beeinflussen. Im Maus-Modell inhibiert PXR Aktivierung die FoxA2 Aktivität, wodurch die Expression des CPT1 gehemmt wird.

Dazu gehört die Induktion der ATP-Citrat-Lyase (ACL), welche die Bildung von Acetyl-CoA aus Citrat katalysiert (Fukuda et al., 1992). Das Acetyl-CoA wird dann mittels Acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1) zu Malonyl-CoA umgewandelt (C. Wang et al., 2010). Die Aufteilung der

über die Fettsäuresynthase (*fatty acid synthase*, FAS) entstandenen Fettsäuren in gesättigte und einfachgesättigte freie Fettsäuren wird, zum Beispiel, durch die Stearoyl-CoA-Desaturase 1 (SCD1) reguliert (Z. Z. Li et al., 2009), während die Fettsäure-Elongase 6 (*elongation of very-long-chain fatty acids 6*, ELOVL6) die entstandenen Fettsäuren verlängern kann (Zhao et al., 2017). Allerdings reguliert PXR die Gene *ACL*, *ACC1*, *FAS*, *SCD1* und *ELOVL6* nur indirekt durch Induktion des SREBP1a (*sterol regulatory element-binding protein*) nach Rifampicin-Behandlung (Bitter et al., 2015).

Die PXR-abhängige Regulierung von ACC1 erfolgt neben SREBP1a auch über die Erhöhung der AKR1B10 (*aldo-keto reductase family 1 B10*) Expression durch sowohl PXR Knock-down wie auch PXR Aktivierung (Bitter et al., 2015). AKR1B10 ist, wie ACC1, ein zytosolisches Protein und verhindert durch die Bindung an ACC1 dessen Degradierung (Ma et al., 2008).

Auch die Expression des THRSP (*thyroid hormone-responsive spot 14 homolog*) ist nach Rifampicin Behandlung induziert. Es bewirkt die Hochregulierung der FAS-Expression, was ebenfalls auf eine indirekte Regulation des FAS mittels PXR über THRSP schließen lässt (Moreau et al., 2009).

Diverse Fettsäuren werden für die mitochondriale β -Oxidation verwendet. Dieser Schritt wird durch die Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT1) reguliert, das einzige humane Gen, das am Transport der Fettsäuren für die β -Oxidation beteiligt ist und dessen Expression in Mäusen durch PXR Aktivierung und die daraus folgende FoxA2 Repression gehemmt wird (Hakkola et al., 2016; Moreau et al., 2009).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es durch PXR Aktivierung zu einer verstärkten *de novo* Lipidsynthese kommt, während gleichzeitig der Abbau von Lipiden vermindert wird.

Ebenfalls hat PXR das Potential, die Endokrinhomöostase zu stören und die Androgen-Aktivität zu verringern. *CYP3A* und *SULT2A*, zwei bekannte humane PXR Zielgene, mit Einfluss auf die Androgen-Aktivität, beeinflussen ebenfalls die Gallensäuredetoxifikation. Außerdem scheint die PXR Aktivierung eine Hyperbilirubinämie in Mäusen zu verhindern, wobei die Gene *UGT1A1*, *OATP2* oder *MRP2* involviert sind (Ihunnah et al., 2011).

Von einer PXR Aktivierung durch Vitamin K2 wurde ebenfalls berichtet, was PXR mit Knochenbildung in Verbindung bringt. Indirekt beeinflusst PXR auch den Retinsäure Metabolismus, da PXR die Expression von CYP3A und verschiedenen Transportern induziert, die den Metabolismus beschleunigen (Ihunnah et al., 2011).

Weiterhin scheint PXR Aktivierung immunsuppressiv zu wirken, was auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) zurückgeführt wird. NF- κ B ist wichtig für die Erhaltung der Immunantwort und der Entzündung. PXR wird durch NF- κ B Aktivierung inhibiert, während Inhibierung von NF- κ B die PXR Aktivierung verstärkt (Ihunnah et al., 2011).

Viele Prozesse, auf die PXR regulatorisch Einfluss hat, sind bereits bekannt. Kandel und Kollegen beschreiben weitere Gene, die durch PXR reguliert erscheinen (Kandel et al., 2016). Dazu gehören auch die Gene Ethanolamin-Phosphat Phospho-Lyase (*ETNPPL*) und SEC14-ähnliches Protein 4 (*SEC14L4*), die in Beziehung zum Phospholipidstoffwechsel stehen. Daraus folgt die Hypothese, dass PXR an der Regulation des Phospholipidstoffwechsels beteiligt sein könnte.

1.4 Ethanolamin-Phosphat Phospho-Lyase

Bereits 1970 beschrieben Fleshood und Pitot ein Enzym, das die Reaktion von Phosphoethanolamin (O-Phosphorylethanolamin) zu Acetaldehyd, Ammoniak und Phosphat katalysiert. Sie nannten es O-Phosphorylethanolamin Phospho-Lyase. Dieses Enzym hat ein pH Optimum von 7.8 und ist höchst spezifisch für Phosphoethanolamin. Anorganisches Phosphat wirkt als kompetitiver Inhibitor und es wird durch Schwermetall-Kationen, Sulfationen und Cyanidionen inaktiviert. Es hat ein Molekulargewicht von 168.000 g/mol und wird vor allem in der Leber, aber auch in der Niere und dem Gehirn, exprimiert (Fleshood & Pitot, 1970). In späteren Publikationen wird dieses Enzym auch Alanine-glyoxylate aminotransferase 2 ähnliches Protein 1 (AGXT2L1) und Ethanolamin-Phosphat Phospho-Lyase (ETNPPL) genannt.

ETNPPL stellt eine Pyridoxalphosphat-abhängige Lyase dar. Da die Deaminierung von Phosphoethanolamin durch ETNPPL irreversibel ist und das Substrat (Phosphoethanolamin) die Funktion der Mitochondrien beeinträchtigt, während die generierten Produkte (Acetaldehyd, Ammoniak, Phosphat) potenziell toxisch sind, ist eine strenge Regulierung erforderlich (Schiroli et al., 2013). Insbesondere Acetaldehyd ist bekannt dafür, dass es Lipidperoxidation und mitochondriale Dysfunktionen induziert (Lieber, 1988). Auf der anderen Seite wird Acetaldehyd zu Acetyl-CoA konvertiert, das in vielen zellulären Prozessen wiederverwendet werden kann (Patel & Witt, 2017).

Über die Expression von ETNPPL ist nicht viel bekannt. Im hepatozellulären Karzinom (HCC), im Magenkarzinom und im Pankreaskarzinom ist ETNPPL herunterreguliert, vermutlich, da in Krebszellen die Lipogenese kontinuierlich aktiviert ist, um genug Lipide für die Membransynthese zur Verfügung zu haben (Deng et al., 2020; Ding et al., 2016). Außerdem scheint ETNPPL eine Rolle in der Autophagie zu spielen. Das Phosphatidylethanolamin (PE) ist ein wichtiger Bestandteil der Autophagosombildung und die Konjugation des ATG8/LC3-PE Komplexes wird durch hohe PE-Konzentrationen stimuliert (Deng et al., 2020). Für die PE-Synthese wird das Phosphoethanolamin benötigt, wie in Abbildung 4 grafisch dargestellt. Da das Phosphoethanolamin ebenfalls als Substrat für die durch ETNPPL katalysierte Reaktion nötig ist, ist anzunehmen, dass ETNPPL auch physiologisch an der Regulation der Phospholipidsynthese beteiligt ist (Vettraino et al., 2020).

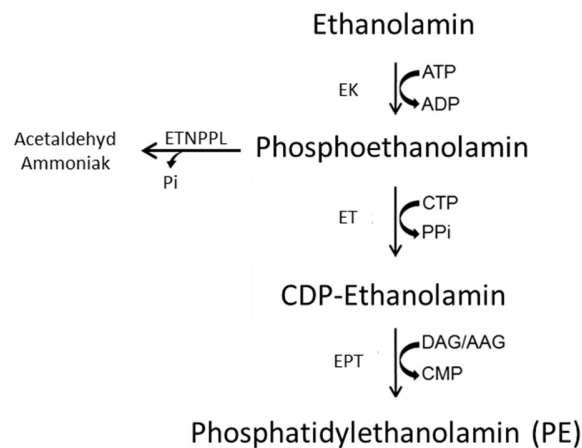


Abbildung 4: ETNPPL katalysiert die irreversible Reaktion von Phosphoethanolamin zu Acetaldehyd und Ammoniak unter Bildung von Phosphat.

Über den CDP-Ethanolamin Syntheseweg wird das Phosphatidylethanolamin (PE) synthetisiert. Dabei wird Ethanolamin durch die Ethanolaminkinase (EK, ETNK1 und ETNK2) zu Phosphoethanolamin phosphoryliert. Das Phosphoethanolamin wird durch die CTP:phosphoethanolamin cytidyltransferase (ET, PCYT2) zu CDP-Ethanolamin synthetisiert. Im letzten Schritt katalysiert die 1,2-diacylglycerol ethanolaminphosphotransferase (EPT, CEPT1 und SELENOI) die Reaktion von CDP-Ethanolamin zu PE durch den Transfer des Phosphoethanolamin zum Diacylglycerol (DAG) oder Alkylacylglycerol (AAG).

PE ist das zweit häufigste Membranphospholipid nach Phosphatidylcholin (PC), das eine wichtige Rolle in der Struktur und Funktion von eukaryotischen Membranen spielt (Gibellini & Smith, 2010).

1.4.1 Phosphatidylethanolamin

Phosphatidylethanolamin (PE) ist ein Glycerophospholipid mit einer Stickstoffgruppe (Darvey, 1998). Es besitzt eine kleine polare Kopfgruppe, die proportional zu den Fettsäureketten, dem PE eine kegelförmige Form gibt. Als Membranlipid unterstützt das PE die Membranfusion und -teilung, so wie die Integration von Proteinen in die Membran und Konformitätsänderungen in der Proteinstruktur (Calzada et al., 2016). Neusynthetisiertes PE kann entweder an seinem Synthesort in Membranen integriert werden, in andere zelluläre Kompartimente gelangen, wird verwendet als Vorläufer anderer Phospholipide, zum Beispiel PC, oder findet als Substrat

für grundlegende posttranslationale Modifikationen Verwendung (Calzada et al., 2016). Zum Beispiel dient PE als Anker für autophagosomale Membranen, in dem es eine kovalente Verbindung mit dem C-terminalen Glyzinrest des ATG8 Proteins eingeht. Das ATG8 Protein reguliert die selektive Autophagie und den Transport von Autophagosomen zu Lysosomen, um, zum Beispiel, in Stresssituationen die Degradierung von zytoplasmatischem Material durchzuführen. Das sichert die Erhaltung der zellulären Homöostase und dient als Qualitätskontrolle (Rockenfeller et al., 2015; Martens et al., 2016).

Das Verhältnis zwischen PC und PE in der Membran wird immer im Gleichgewicht gehalten. Abweichungen führen zu einem Verlust der Membranintegrität und erhöhter Membranpermeabilität. Neben einfachen Entzündungsreaktionen wird ein verändertes PC/PE-Verhältnis auch mit nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung (NAFLD), eingeschränkter Leberregeneration und Leberschaden in Verbindung gebracht (Z. Li et al., 2006; Gibellini & Smith, 2010; van der Veen et al., 2017). Außerdem hat das PC/PE-Verhältnis Auswirkungen auf ER Stress (Singh et al., 2012) und die Calciumhomöostase, löst die *unfolded protein response* (UPR) aus (Patel & Witt, 2017) und beeinflusst allgemein den Energiemetabolismus. In Säugerzellen ist das normale PC/PE-Verhältnis 3/1. Sowohl ein zu hohes als auch ein zu niedriges Verhältnis führt zu schwerwiegenden Veränderungen, mit Auswirkungen auf das Überleben und das Wachstum der Zelle (van der Veen et al., 2017).

Die Synthese des PE und PC erfolgt auf ähnlichem Weg über den Kennedy-Pathway, der in zwei Arme aufgeteilt ist. Das PE wird über den CDP-Ethanolamin Syntheseweg synthetisiert, während das PC über den CDP-Cholin Syntheseweg entsteht.

1.4.2 Der Kennedy-Pathway

1956 entdeckten Kennedy und Weiss, dass die Synthese von PE und PC parallel verläuft, siehe Abbildung 5 (Vance, 2008).

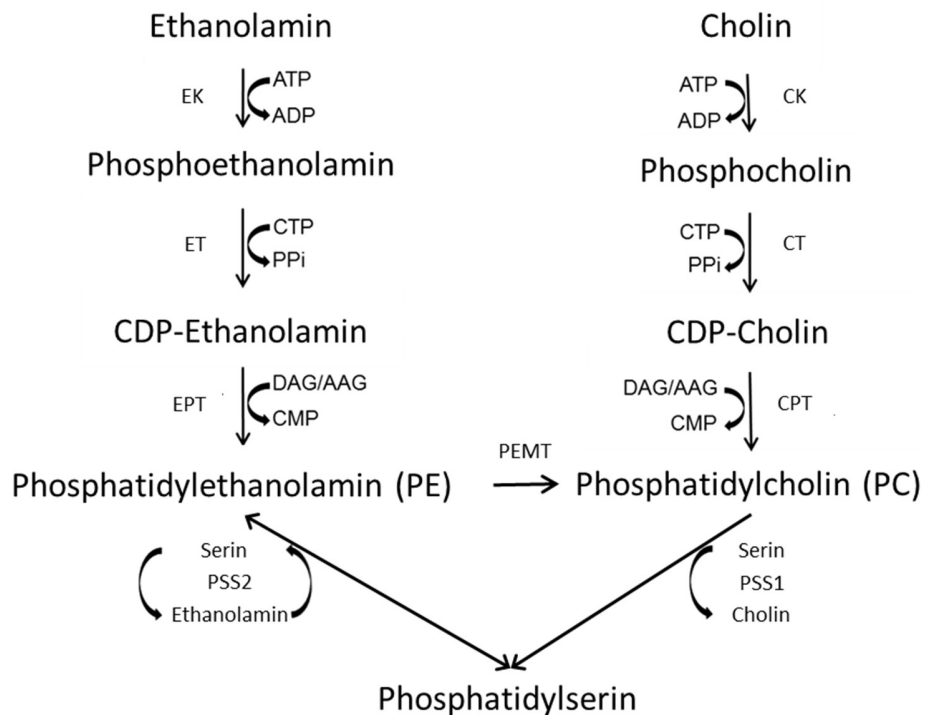


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Kennedy-Pathway (CDP-Ethanolamin und CDP-Cholin Syntheseweg).

Die PE- und PC-Synthese verläuft parallel. Im ersten Schritt, wird das Ethanolamin über die Ethanolaminkinase (EK) und das Cholin über die Cholininkinase (CK, CHKA und CHKB) phosphoryliert. Anschließend wird das entstandene Phosphoethanolamin über die CTP:phosphoethanolamin cytidyltransferase (ET) zu CDP-Ethanolamin und das Phosphocholin mit CTP über die CTP:phosphocholin cytidyltransferase (CT, PCYT1 α oder PCYT1 β) zu CDP-Cholin synthetisiert. Im letzten Schritt wird das Phosphoethanolamin durch die EPT und das Phosphocholin durch die Cholinphosphotransferase (CPT, CHPT1 und CEPT1) vom CDP-Cholin zum Diacylglycerol (DAG) oder Alkylacylglycerol (AAG) transferiert, wodurch Phosphatidylethanolamin (PE) oder Phosphatidylcholin (PC) entsteht. PC kann auch durch Methylierung von PE durch die Phosphatidyl N-Methyltransferase (PEMT) hergestellt werden. Aus dem PE und dem PC kann Phosphatidylserin (PS) synthetisiert werden, dieser Schritt wird über die Phosphatidylserin Synthasen 1 und 2 (PSS1 und PSS2) katalysiert. Das PE kann ebenfalls durch eine Basenaustauschreaktion entstehen, bei der zum Beispiel die Serin-Kopfgruppe des PS durch Ethanolamin ausgetauscht wird.

In einer typischen Säugetierzelle ist PC das häufigste Phospholipid mit etwa 50 %, während PE mit 20 % das zweithäufigste Phospholipid darstellt (Calzada et al., 2016). Beide Phospholipide

können in Diacyl- (Acylbindung), Alkylacyl- (Etherbindung) oder Alkenylacylphospholipide (Vinyletherbindung) unterteilt werden.

Während der Synthese wird hauptsächlich Cytidintriphosphat (CTP) verwendet, statt des üblichen Adenosintriphosphats (ATP), was für metabolische Prozesse ungewöhnlich, aber ebenso energiereich ist. Für die PC-Synthese wird Cholin mittels Transporter (z.B. CHT1, CTL-Familie, OCT-Familie) in die Zelle transportiert. Im Zytosol wird das Cholin durch die Cholinkinasen (CK, *CHKA* und *CHKB*) phosphoryliert. Durch die CTP:phosphocholin cytidylyltransferasen (CT, *PCYT1a* und *PCYT1b*) wird aus dem Phosphocholin unter Verwendung von CTP CDP-Cholin synthetisiert. Dieser Schritt ist der geschwindigkeitsbestimmende. Der letzte Schritt wird durch das integrale ER Membranprotein 1,2-diacylglycerol cholinphosphotransferase (CPT, *CHPT1*) oder 1,2-diacylglycerol cholin/ethanolaminphosphotransferase (CPT, *CEPT1*) katalysiert. Dabei wird das Phosphocholin vom hoch energetischen CDP-Cholin zum Diacylglycerol (DAG) oder Alkylacylglycerol (AAG) transferiert, wobei PC entsteht. PC kann aber auch durch die Methylierung von PE synthetisiert werden. Dabei katalysiert die Phosphatidylethanolamin N-Methyltransferase (PEMT) drei Methylierungsschritte. Als kleines (ca. 20 kDa), integrales ER-Membranprotein ist die PEMT vor allem in der Mitochondrien-assoziierten Membran (MAM) des ER angereichert. Die MAM besitzt eine spezifische Domäne, um den Kontakt zwischen ER und der äußeren mitochondrialen Membran herzustellen (van der Veen et al., 2017).

Die PE-Synthese findet hauptsächlich im ER über den CDP-Ethanolamin Syntheseweg statt oder in den Mitochondrien mittels Decarboxylierung des Phosphatidylserin (PS). Ein eher kleiner Anteil an PE entsteht mittels Calcium-abhängiger Basenaustauschreaktion durch die PS Synthase-2 (PSS2), wobei die Base Serin vom PS gegen Ethanolamin ausgetauscht wird (van der Veen et al., 2017), oder durch Acetylierung des Lyso-PE (Vance, 2008; Calzada et al., 2016; Patel & Witt, 2017).

Freies Ethanolamin ist vor allem im Blut (0 - 12 μ M bei Erwachsenen und 26 - 92 μ M bei Neugeborenen) und in der Brustmilch ($46 \pm 18,1 \mu$ M) aber auch in hohen Konzentrationen im gastrointestinalen Trakt enthalten. Eukaryoten können Ethanolamin nicht selbst synthetisieren. Sie müssen es über die Nahrung als freies Ethanolamin, PE, Sphingosinphosphat oder in Form des Endocannabinoids Anandamid aufnehmen (Patel &

Witt, 2017; The Metabolomics Innovation Center (TMIC), 2021). In der Zelle wird das Ethanolamin, wie auch das Cholin, mittels Ethanolamin-spezifischer Kinasen (EK) im Zytosol phosphoryliert (van der Veen et al., 2017). Die Ethanolaminkinasen werden durch zwei Gene kodiert. Die Ethanolaminkinase 1 (*ETNK1*) phosphoryliert sowohl Ethanolamin als auch in geringem Maße Cholin, während die Ethanolaminkinase 2 (*ETNK2*) spezifisch für Ethanolamin ist (Vance, 2008). Im zweiten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird das Phosphoethanolamin mit CTP zu CDP-Ethanolamin und Pyrophosphat durch die CTP:phosphoethanolamin cytidylyltransferase (ET) konvertiert (van der Veen et al., 2017). ET wird durch das Gen *PCYT2* codiert (Zhu et al., 2008). Das 50 kDa schwere Enzym existiert vor allem als Dimer und ist im Zytosol oder den Zisternen des rauen ER zu finden (Fullerton & Bakovic, 2010; Pavlovic & Bakovic, 2013). Es enthält zwei CTP Bindemotive und weist zwei evolutionär konservierte Spleißvarianten auf, die sich in ihrer katalytischen Funktion und der Expression in verschiedenen Geweben unterscheiden. *PCYT2α* kodiert für das komplette Protein, bei *PCYT2β* fehlt Exon 7, das interne Linkerpeptid. Beide Spleißvarianten produzieren aktive Enzyme, wobei *PCYT2α* eine 2-fach höhere Affinität zu Phosphoethanolamin aufweist (Fullerton & Bakovic, 2010). Die hohe Substratspezifität für Phosphoethanolamin schließt Interaktionen mit Phosphocholin trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit aus. Das Phosphocholin ist nur ein schwach kompetitiver Inhibitor. ET wird durch das *early growth response protein 1* (EGR1) und NF-κB reguliert und spielt eine wichtige Rolle in der Proliferation von Krebszellen, posttranslationalen Modifikationen, bei Fettleibigkeit und dem metabolischen Syndrom. Obwohl die Katalyse durch ET der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, kann auch die Verfügbarkeit von Ethanolamin und DAG die PE Synthese limitieren (Pavlovic & Bakovic, 2013).

Im letzten Schritt des CDP-Ethanolamin-Synthesewegs wird die Ethanolamingruppe des CDP-Ethanolamin mittels der integralen ER Membranproteine CEPT, das auch im CDP-Cholin Syntheseweg den letzten Schritt katalysiert, oder der spezifischeren 1,2-ethanolaminphosphotransferase (EPT, *SELENOI* oder *EPT1*) zum DAG oder AAG transferiert, wodurch PE entsteht (van der Veen et al., 2017; McMaster & Bell, 1997).

Die PE-Synthese in den Mitochondrien findet über den PS Decarboxylase (PSD)-Syntheseweg in der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran statt. Das benötigte PS wird durch

zwei PS Synthesen (PSS1 und PSS2) synthetisiert, die in der MAM des ER angereichert sind. Die Translokation des PS vom ER/MAM zur PSD in den Mitochondrien ist ATP-abhängig und der limitierende Faktor dieses Synthesewegs (van der Veen et al., 2017).

Der Hauptanteil des PE in eukaryotischen Zellen wird über den CDP-Ethanolamin-Syntheseweg synthetisiert. Allerdings scheint in der Zellkultur der PSD-Syntheseweg vorrangig zu sein, auch wenn Ethanolamin angeboten wird. Obwohl beide Synthesewege alle PE-Spezies synthetisieren können, enthalten die PE Pools aus dem CDP-Ethanolamin-Syntheseweg vor allem einfach- oder zweifachungesättigte Acylketten, während die PE Pools aus dem PSD-Syntheseweg vor allem mehrfachungesättigte Acylketten enthalten. Ein kompletter Verlust einer der Synthesewege kann durch den anderen Syntheseweg nicht ersetzt werden (Vance, 2008).

Die Bedeutung von ETNPPL für die PE-Synthese, und damit für den Kennedy-Pathway, ist noch nicht vollständig erforscht. Hier sind weitere Untersuchungen nötig.

Neben ETNPPL gibt es noch weitere Gene, deren Produkte möglicherweise den Kennedy-Pathway beeinflussen, zum Beispiel das SEC14-ähnliche Protein 4 (SEC14L4). Kandel und Kollegen zeigten mit ihrer genomweiten Mikroarrayanalyse, dass auch SEC14L4, wie ETNPPL, durch Rifampicin-Behandlung induziert wird (Kandel et al., 2016).

1.5 SEC14-ähnliches Protein 4/tocopherol assoziiertes Protein 3

Bereits 1989 berichteten Bankaitis und Kollegen von einem Gen in *Saccharomyces cerevisiae*, dem sogenannten *SEC14* das eine Rolle im Proteintransport durch den Golgi-Apparat spielen soll (Bankaitis et al., 1989). Das *SEC14* kodiert für ein zytosolisches Polypeptid (SEC14p), das als Sensor für das PC/Phosphatidylinositol (PI) Verhältnis dient (Kempná et al., 2003) und als Transferprotein für PC und PI beschrieben wird (Habermehl et al., 2004; Curwin et al., 2009). Durch die Bindung von PC reguliert das SEC14p den CDP-Cholin-Syntheseweg in der Hefe. PC gebunden an SEC14p inhibiert effektiv die Enzymaktivität des CT, das den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im CDP-Cholin-Syntheseweg katalysiert (Howe &

McMaster, 2006; Mousley et al., 2007). Weiter konnte gezeigt werden, dass PC gebundenes SEC14p die Phospholipase B NTE1 (*NTE1*) in der Hefe aktiviert, die die Reaktion von PC zu Glycerophosphocholin (GPC) katalysiert (Howe & McMaster, 2006; Curwin et al., 2009). Wie SEC14p Einfluss auf den CDP-Cholin-Syntheseweg nimmt, ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

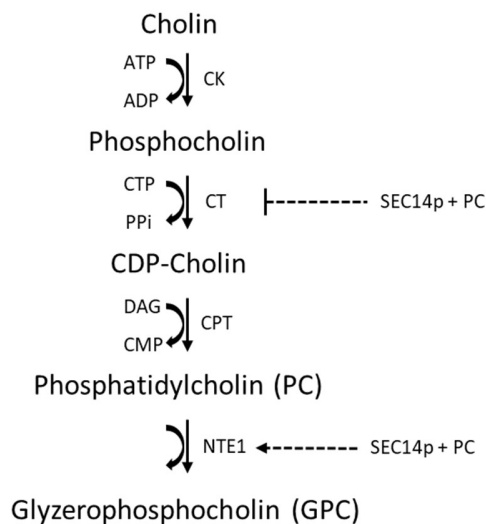


Abbildung 6: Schematische Darstellung des CDP-Cholin Synthesewegs in der Hefe, indem SEC14p die Phosphatidylcholin (PC)-Synthese durch Inhibition des CT und Aktivierung von NTE1 reguliert.

Im CDP-Cholin Syntheseweg wird im ersten Schritt Cholin durch die Chokinasen (CK, CHKA und CHKB) phosphoryliert. Das entstandene Phosphocholin wird durch die CTP:phosphocholin cytidilyltransferasen (CT, PCYT1) unter Verwendung von CTP zu CDP-Cholin synthetisiert. Im letzten Schritt wird das Phosphocholin vom CDP-Cholin zum Diacylglycerol (DAG) oder Alkylacylglycerol (AAG) durch die 1,2-diacylglycerol cholinphosphotransferase (CPT, CHPT1 und CEPT1) transferiert, wobei PC entsteht. In der Hefe wird durch Bindung von PC an SEC14p die Aktivität des CT inhibiert und die Phospholipase B (NTE1) aktiviert. NTE1 katalysiert die Synthese des Glycerophosphocholin (GPC) aus PC (Howe et al 2006).

Außerdem ist SEC14p essenziell für die Viabilität der Hefezellen und wird für den Membrantransport benötigt (Mousley et al., 2007).

Dieses SEC14p dient als Prototyp für ein Proteinmodul, das SEC14-Domäne genannt wird (Saito et al., 2007), aber auch als CRAL-TRIO Domäne bekannt ist und eine große hydrophobe Tasche darstellt (Habermehl et al., 2004). Die humane SEC14-Domäne bindet vor allem

hydrophobe Liganden, zum Beispiel Phospholipide (Curwin et al., 2009) und kann diese auch aus der Lipid-Doppelschicht extrahieren (Saito et al., 2007).

Im humanen Genom wurden mindestens 29 Gene gefunden, die die SEC14-Domäne enthalten und für mehr als 45 Proteine kodieren (Curwin et al., 2009). Sie werden oft auch als SEC14-ähnliche Proteine beschrieben und sind gerade in Eukaryoten mit weiteren Domänen ausgestattet, zum Beispiel der *Golgi Dynamics* (GOLD)-Domäne (Mousley et al., 2007). Proteine mit nur der SEC14-Domäne, sind gute Lipidtransporter, während die Proteine mit mehreren Domänen deutlich komplexere Funktionen, wie Signaltransduktion, Transport, Lipidmetabolismus und Integration in andere biochemische Prozesse, ausführen können. Interessant sind hier vor allem die humanen Tocopherol assoziierten Proteine (hTAP) 1-3, auch SEC14-ähnliche Protein 2-4 (SEC14L2-4) genannt, die sich alle in einem Bereich von 100 kb auf Chromosom 22 befinden. Sie besitzen neben der SEC14-Domäne auch eine C-terminale GOLD-Domäne und es wird vermutet, dass sie als Protein-Protein Interaktionsmodule agieren, die an der Golgi Funktion und im Transport beteiligt sind (Saito et al., 2007). Außerdem führt die Deletion der GOLD-Domäne zu einer intrazellulären Standortveränderung der SEC14-ähnlichen Proteine. Daraus lässt sich schließen, dass diese Domäne eine Rolle bei der Lokalisierung spezifischer Enzyme und Zellkompartimente spielt (Zingg et al., 2008).

Durch die Ähnlichkeit zwischen dem Sekretionsweg und weiteren konservierten Funktionen der Hefe und dem der Säugetiere kann die Verbindung des PC-Metabolismus mit der Sekretion aus dem Golgi auch in Säugern vermutet werden (Howe & McMaster, 2006; Bankaitis et al., 1989).

Trotzdem ist die genaue Funktion der humanen SEC14-ähnlichen Proteine noch nicht bekannt. SEC14L2 (hTAP1) scheint eine Rolle in Zellen des nativen Immunsystems zu spielen, während SEC14L3 (hTAP2) invers mit allergischen Atemwegsentzündung korreliert. SEC14L4 (hTAP3) ist in den meisten Zelllinien nicht nachweisbar und nur in primären Zellen oder Geweben zu messen. Daher ist die genaue Funktion nicht bekannt. Es wird vermutet, dass SEC14L4 mit der Proliferation interferiert und daher durch DNA Hypermethylierung in Zelllinien ausgeschaltet ist. Zingg und Kollegen vermuten, dass SEC14L4 an der Erhaltung oder Regulierung von Lipiden oder Vitamin E und dem Vesikel Fluss zwischen oder innerhalb der sekretorischen Zellen, wie

den epithelialen Kanalzellen (*epithelial duct cells*) verschiedener Drüsen, eine Rolle spielt (Zingg et al., 2008).

Immer wieder werden die SEC14-ähnliche Proteine mit dem intrazellulären Lipidtransport in Verbindung gebracht. Sie erkennen Phospholipide, Squalene, Tocopherol-Analoga und Derivate, was vermuten lässt, dass SEC14-ähnliche Proteine an der zellulären Aufnahme, der intrazellulären Verteilung und der Sekretion von verschiedenen Liganden beteiligt sind (Kempna et al., 2010).

Die Regulierung und Funktion von SEC14L4 ist bis heute nicht untersucht worden.

1.6 Ziel der Arbeit

PXR wurde bereits als mögliches Zielmolekül in verschiedenen Therapien, zum Beispiel von Cholestase und NAFLD, diskutiert. Für die vollständige Etablierung ist es notwendig die PXR-abhängigen Signalwege umfassend zu untersuchen, um Auswirkungen der Modulierung der PXR-Aktivität auf den Zellmetabolismus abschätzen und das Risiko für unerwünschte Nebenwirkungen verringern zu können.

Bereits in einer vorhergehenden Arbeit wurde eine genom-weite Genexpressionsanalyse mit primären humanen Hepatozyten durchgeführt. Dabei konnten *ETNPPL* (*AGXT2L1*) und *SEC14L4* identifiziert werden, die durch die Behandlung von Hepatozyten mit dem prototypischen PXR Agonisten Rifampicin in ihrer Expression verändert wurden (Kandel et al., 2016). Der Nachweis, dass PXR aktiv an der Regulation der Gene beteiligt ist, musste noch erbracht werden, ebenso wie die Untersuchung des molekularen Mechanismus und die funktionellen Konsequenzen der Regulation durch PXR, was in dieser Arbeit im Fokus stand.

Da *ETNPPL* und *SEC14L4* im Zusammenhang mit dem Phospholipidstoffwechsel stehen, ergibt sich die Hypothese, dass PXR an der Regulation des Phospholipidstoffwechsels beteiligt sein könnte.

Die Regulierung von *ETNPPL* und *SEC14L4* durch PXR sollte in dieser Arbeit genauer untersucht werden. Dabei lag der Fokus insbesondere auf dem molekularen Mechanismus der Geninduktion. Auch das Zusammenspiel von *ETNPPL* und PXR im Hinblick auf den Kennedy-

Pathway wurde betrachtet. Die damit verbundenen metabolischen Konsequenzen sollten ebenfalls untersucht werden, um daraus auf die Funktion von ETNPPL im Phospholipidstoffwechsel und die Auswirkungen der Regulation durch PXR schließen zu können.

2 Material

2.1 Chemikalien & Reagenzien

	Chemikalien und Reagenzien	Firma
Zellkultur	Minimum Essential Medium (MEM)	Gibco
	Penicillin/Streptomycin	Gibco
	L-Glutamin (200 mM, 0,85 % NaCl Solution)	Lonza
	Fötales Kälber Serum (FCS)	Biowest®
	Norit® A (Aktivkohle)	Serva
	Dextran 70	Amersham Biosciences
	William's Medium E	Gibco
	Insulin-Transferrin-Selenium-G (ITS-G)	Gibco
	Dexamethason	Sigma Aldrich
PCR	Q5® Reaction Buffer, 5X concentrate	New England BioLabs (NEB)
	Q5® High GC Enhancer, 5X concentrate	New England BioLabs (NEB)
	Q5® Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase, 2000 U/mL	New England BioLabs (NEB)
	dATP 2'Deoxyadenosine 5' Triphosphate, 100 mM solution pH 7,5, 25 µmol	Applied Biosystems /Roche
	dTTP 2'Deoxythymidine 5' Triphosphate, 100 mM solution pH 7,5, 25 µmol	Applied Biosystems /Roche

	dCTP 2'Deoxyctosine 5' Triphosphate, 100 mM solution pH 7,5, 25 µmol	Applied Biosystems /Roche
	dGTP 2'Deoxyguanosine 5' Triphosphate, 100 mM solution pH 7,5, 25 µmol	Applied Biosystems /Roche
Agarose-Gel	UltraPure™ Agarose	Invitrogen
	Phor Agarose	Biozym
	1 kb PLUS DNA Ladder	Invitrogen
	50bp DNA Ladder	Invitrogen
	Ethidiumbromidlösung 0,0025% i.d. Tropfflasche, wässrige Lösung (250 µg/mL)	Roth
	30% Acrylamid/Bis	Bio-Rad
	10% Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
	TEMED, 99% p.a. für die Elektrophorese	Roth
Verdau	NEB Puffer 3.1, 10X konzentriert	New England BioLabs (NEB)
	NEB Puffer Cutsmart, 10X concentrate	New England BioLabs (NEB)
Dephosphorylierung	10X Antarctic Phosphatase Reaction Buffer	New England BioLabs (NEB)
	Antarctic Phosphatase (5 U/mL)	New England BioLabs (NEB)
Ligation	T4 DNA-Ligase (1 U/µL)	Roche

Sequenzierung	Big Dye® Terminator v1.1, v3.1 5X Sequencing Buffer	Applied Biosystems
	Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100	Applied Biosystems
	Natriumacetat (NaAC)	Merck
	Absolut Ethanol	Merck
	LiChrosolv® Water for chromatography (LC-MS Grade)	Merck
Transfektion	jetPRIME® buffer sterile filtered 0,2 µm	Polyplus
	jetPRIME® Transfection Reagent	Polyplus
	Rifampicin	Calbiochem
	Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Reportergen-Assay	5X Passive Lysis Buffer	Promega
	Coelenterazin	BIOTREND Chemikalien GmbH
	Luciferin	Roth
	Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate	Alfa Aesar
	Glycyl-Glycin 99 %	Sigma
	Coenzym A	Applied Biosystems

Gel-Shift	TNT® T7 Quick Master Mix	Promega
	1 mM Methionin	Promega
	2 U/μL Klenow Enzym	Roche
	[alpha-P32]dCTP, 3000 Ci/mmol, 10 μCi/μL	Hartmann Analytic
	Illustra™ ProbeQuant™ G-50 Micro Columns	GE Healthcare
	Aquasafe 300+	Zinsser Analytic
cDNA	10X TaqMan RT Buffer	Applied Biosystems /Roche
	25 mM MgCl ₂	Thermo Scientific
	dNTP Mix, 2,5 mM each	Applied Biosystems
	Random Hexamere, 50 μM	Invitrogen
	RNase Inhibitor (20 U/μl)	Applied Biosystems
	Multi Scribe Reverse Transkriptase, 50 U/μL)	Applied Biosystems
Fluidigm	TaqMan® PreAmp Master Mix	Applied Biosystems
	2X Assay loading reagent	Fluidigm
	20X TaqMan gene expression assay	Life Technologies
	2X PCR Mastermix for probe assay	Eurogentec
	GE sample reagent	Fluidigm

Mutagenese	Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	New England BioLabs (NEB)
	2X KLD Reaction Buffer	New England BioLabs (NEB)
	10X KLD Enzyme Mix	New England BioLabs (NEB)
Protein-Isolation	Bicinchoninic Acid solution (Bicinchoninsäure, Natriumcarbonat, Natriumtartrat und Natriumbicarbonat in 0,1 M NaOH)	Sigma Life Science
	4% Copper(II) sulfate solution (w/v) prepared from copper(II)sulfate pentahydrate	Sigma Aldrich
	Natrium orthovanadat (99,98 %)	Sigma
	Halt™ Protease Inhibitor	Thermo Scientific
	PMSF	Roth
	Bovine Serum Albumin (Fatty Acid Free) (BSA)	PAA/Sigma
	Sodium Dodecylsulfate (SDS)	Serva
	Natriumfluorid (NaF)	Sigma
	Sodium β -glycerophosphate pentahydrate	Alfa Aesar
	Triton-X-100	Sigma
	Natrium butyrate	
	Natrium deoxycholate	Sigma
Glycerol for mol. Biol. $\geq 99\%$	Sigma	

Western Blot	Ponceau-Lösung	Sigma
	Magermilchpulver für die Mikrobiologie	Merck
	Supersignal® Enhanced Molecular Weight Protein Ladder	Thermo Scientific
	Supersignal® West Dura Extended Detection substrate	Thermo Scientific
	Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific
NNMT	Methanol	Roth
	Acetonitril (ACN)	Roth
	Ethanolamin	Sigma
	O-Phosphorylethanolamine	Sigma
	CDP-ethanolamine sodium salt hydrate	Sigma
	PE / Lyso-PE	Avanti
	2-Aminoethan-1,1,2,2-d4-ol	Toronto Research Chemicals
	Phosphorylethanolamine-d4	Toronto Research Chemicals
	Bromphenol Blue	Fluka
	Ethylendiaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate 99 % (EDTA)	Serva /Sigma
	β-Mercapthoethanol	Sigma
	Formaldehyd	Sigma
	Formamid	Sigma

	TRIS PUFFERAN® ≥99,9%	Roth
	TRIS-hydrochlorid PUFFERAN® ≥99%	Roth
	Sodium chlorid for analysis (NaCl), ENSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur	Merck
	Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth
	Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth
	Acetic acid (glacial) (<i>Eisessig</i>)	Merck
	1,4-Dithiothreit (DTT)	Roth
	Boric Acid	Sigma
	HEPES PUFFERAN®	Roth
	Kaliumchlorid (KCl) ≥99,5%, p.a. ACS, ISO	Roth
	TWEEN®-20	Sigma
	3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)	Merck
	Glycine GR for analysis	Merck
	Nonidet P40 (NP-40)	Roche
	Trypton BioChemica (Bacto-Trypton)	AppliChem
	Bacto™-Agar	BD
	Hefeextrakt	Roth
	Ampicillin (Amp)	Roth
	Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Roth

2.2 Medien für Zellkultur und Bakterienkultivierung

Bezeichnung	Finale Konzentration	Komponenten
HepG2 (Kulturmedium)	10 % 2 mM 100 U/mL 100 µg/mL	MEM FCS L-Glutamin Penicillin Streptomycin
HepG2 (Einfriermedium)	20 % 10 %	Kulturmedium FCS DMSO
HepG2 (Kulturmedium für Transfektion)	10 % 2 mM 100 U/mL 100 µg/mL	MEM Fötales Kälber Serum (FCS)/Dextran coated charcoal(DCC) L-Glutamin Penicillin Streptomycin

Serumfreies Medium mit Ethanolamine für primäre humane Hepatozyten (PHH)	2 mM 100 U/mL 100 µg/mL 0,1 % 1 % 100 nM 25 µM	William's Medium E Glutamin Penicillin Streptomycin DMSO Insulin-Transferrin-Selenium-G (ITS-G) Dexamethason Ethanolamin
SOC-Medium	20 g/L 5 g/L 8,4 mM 9,8 mM 9,8 mM	Bacto-trypton Hefeextrakt NaCl MgCl ₂ MgSO ₄
LB-Medium + Amp	10 g/L 10 g/L 5 g/L 14 g/L 100 mg/mL	Bacto-trypton NaCl Hefeextrakt Bacto-Agar Ampicillin

2.3 Plasmide

Plasmide	Kurzbeschreibung u. ev. Referenz
pcDNA3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
pUC18	Expressionsvektor aus Prokaryoten, mit Amp-Resistenz und LacZ-Gen (2686 bp); Herkunft: Amersham Pharmacia
pcDhuPXR	Open reading frame (ORF) von PXR kloniert in pcDNA3 (Geick et al., 2001)
pcDhuPXR-FLAG	Open reading frame (ORF) von PXR, markiert mit FLAG-Epitop kloniert in pcDNA3 (Jeske et al., 2017)
pcDhuRXR α (orf)	5'-Abschnitt des humanen RXR α aus dem pCMX-hRXR α (Mathäs et al., 2014)
pcDhuLXR α	Open reading frame (ORF) von LXR kloniert in pcDNA3 (Piedade et al., 2015)
pcDhuLXR β	Open reading frame (ORF) von LXR kloniert in pcDNA3 (Piedade et al., 2015)
pcDhuETNPPL	Open reading frame von NM_031279.3, kloniert in pcDNA3; O.Burk, unveröffentlicht
pGL3-Tk-SERPINB9P1-1.2	1.2 kb der proximalen Promotorregion von SERPINB9P1 (-13 bis -1163, mit PXR Bindestellen) in pGL3-Tk(-105); O. Burk, unveröffentlicht
pGL3-Tk(SMPDL3A-LXRE)	(Jeske et al., 2017)

pGL3-Tk(-105)	Reportergenvektor; modifizierter pGL3-Basic Vektor mit zusätzlicher Thymidinkinase (TK)-Promotor Sequenz von -105 bis +51 (4964 bp) (Geick et al., 2001)
pGL3-Basic	Promotor-loser Reportergenvektor, mit Amp-Resistenz und Luciferase-Gen (4818 bp); Herkunft: Promega
pGL4.10(luc2)	Promotor-loser Reportergenvektor mit Leuchtkäfer-Luciferase; Promega
pGL3-Tk ETNPPL 10kbup/R1 (35-882)	Entspricht R5 in Abbildung 9 (ff); AC097473.3 Position 35751-36598
pGL3-Tk ETNPPL 10kbup/R2 (2430-3001)	Entspricht R4 in Abbildung 9 (ff); AC097473.3 Position 33632-34203
pGL3-Tk ETNPPL 10kbup/R3 (4608-5236)	Entspricht R3 in Abbildung 9 (ff); AC097473.3 Position 31397-32025
pGL3-Tk ETNPPL 10kbup/R4 (5937-6350)	Entspricht R2 in Abbildung 9 (ff); AC097473.3; Position 30283-30696
pGL3-Tk ETNPPL 10kbup/R5 (8548-9053)	Entspricht R1 in Abbildung 9 (ff); AC097473.3 Position 27580-28086
pGL3-Tk SEC14L4 15kbup/S2 (944-2096)	AC004832.3; Chr22:30.488.902-30.505.711; Position 115223-116174
pGL3-Tk SEC14L4 15kbup/S1 (2872-3559)	AC004832.3; Chr22:30.488.902-30.505.711; Position 116944-117560
pGL3-Tk SEC14L4 15kbup/S4 (5313-6197)	AC004832.3; Chr22:30.488.902-30.505.711; Position 123197-124227

pGL3-Tk SEC14L4 15kbup/S3 (11827-12443)	AC004832.3; Chr22:30.488.902-30.505.711; Position 125828-126515
pGL3-Tk SEC14L4 downstream/SE1 (217-630)	AC004832.3; Chr22:30.488.902-30.505.711; Position 113741-114154
pGL3-Tk SEC14L4 downstream/SE3 (2806-3703)	AC004832.3; Chr22:30.488.902-30.505.711; Position 110668-111565
pGL3-Tk SEC14L4 downstream/SE6 (5758-6787)	AC004832.3; Chr22:30.488.902-30.505.711; Position 107584-108613
pGL3-Tk SEC14L4 downstream/SE4 (7129-7475)	AC004832.3; Chr22:30.488.902-30.505.711; Position 106896-107179
pGL3-Tk SEC14L4 downstream/SE5 (7637-8227)	AC004832.3; Chr22:30.488.902-30.505.711; Position 106144-106734
pGL3-Tk SEC14L4 downstream/SE2 (8461-8902)	AC004832.3; Chr22:30.488.902-30.505.711; Position 105469-105910
pGL4.10(luc2) ETNPPL 10kbup/R5-Exon1.2	Entspricht R1; ETNPPL R1-Region geklont bis zum ersten Exon1.2, in pGL4.10(luc2)-Vektor
pGL4.10(luc2) ETNPPL 10kbup/R4+R5-Exon1.2	Entspricht R1-R2; ETNPPL R2-Region geklont vor R1-Konstrukt, in pGL4.10(luc2)-Vektor, Entspricht dem R1-R2-Konstrukt
pGL4.10(luc2) ETNPPL 10kbup/Exon1.2	Entspricht Promotor; ETNPPL R1-Region ausgeschnitten, nur erstes Exon1.2, in pGL4.10(luc2)-Vektor
pGL4.10(luc2) ETNPPL 10kbup/R4+Exon1.2	Entspricht R2; ETNPPL R1-Region aus R1-R2-Konstrukt ausgeschnitten, in pGL4.10(luc2)-Vektor

pGL4-10(luc2) ETNPPL 10kbup/R5-Exon1.2- mutDR4.1	Entspricht mDR4-1; Mutation des ersten DR4-Motivs im R1-Konstrukt, im pGL4.10(luc2)-Vektor
pGL4-10(luc2) ETNPPL 10kbup/R5-Exon1.2- mutDR4.2	Entspricht mDR4-2; Mutation des zweiten DR4-Motivs im R1-Konstrukt, im pGL4.10(luc2)-Vektor
pGL4-10(luc2) ETNPPL 10kbup/R5-Exon1.2- mutDR4.1-DR4.2	Entspricht mDR4-beide; Doppel-Mutation beider DR4-Motive im R1-Konstrukt, im pGL4.10(luc2)-Vektor
pGL4-10(luc2) ETNPPL 10kbup/R4+Exon1.2- mutDR4	Entspricht mDR4; Mutation des DR4-Motivs im R2-Konstrukt, im pGL4.10(luc2)-Vektor
pGL4-10(luc2) ETNPPL 10kbup/R4+Exon1.2- mutDR3-DR4	Entspricht mDR4-DR3; Doppel-Mutation der Kombination aus DR3 und DR4-Motiv im R2-Konstrukt, im pGL4.10(luc2)-Vektor

2.4 Primer

Primer	Sequenz
KS-1	5'-aca ggt acc ctc agc ctc caa agt agc -3'
KS-2	5'-aca aga tct gag acc gag tct cac tct -3'
KS-3.2	5'-aca ggt acc tct gaa gtc tag acg ttc aag acc a-3'
KS-4.2	5'-aca aga tct gac agc att tat tgg gca ctt act a-3'
KS-5.2	5'-aca ggt acc tga gac tgt gcc att gca cta -3'
KS-6.2	5'-aca aga tct aag att gac tct tgt cgc cag -3'
KS-7	5'-aca ggt acc tga gac aca gtc tca ctc t-3'

KS-8	5'-aca aga tct acg tgt gca tat aac tgt gc-3'
KS-9.2	5'-aca ggt acc aac tcc aga cct cag gtg att -3'
KS-10.2	5'-aca aga tct atg tta gcc agg ata gtc tcg at-3'
SE-1	5'-aca ggt acc atg gta cag act gga aca cc-3'
SE-2	5'-aca aga tct agg ttg cag tga acc gag att -3'
SE-3.1	5'-aca ggt acc ctt cta gga att aca gca gca gtc t-3'
SE-4.1	5'-aca aga tct agt agc tgg aac tac agg ca-3'
SE-5	5'-aca ggt acc aag att gta cca tca cac tcc ag-3'
SE-6.2	5'-aca aga tct taa act tcc ctt ggt cac gc -3'
SE-7.1.1	5'-aca ggt acc cag aga aat tgc ttg tct ccc tt-3'
SE-8.1.1	5'-aca aga tct cag gca att ctc atg cct ca-3'
SE-7.1.2	5'-aca ggt acc cta gaa cac aca aga cct gta cag c-3'
SE-8.1.2	5'-aca aga tct aag cca aga tcg cac tac tg-3'
SE-9	5'-aca ggt acc tcc tga gta gct ggg att aca -3'
SE-10	5'-aca aga tct tgg ctc aca gta ggt tct caa ta-3'
S-3	5'-aca ggt acc atg atc ttg gct cac tgc aac -3'
S-4	5'-aca aga tct ata cct tcc tac agt gta gtc aca tgg t-3'
S-5.2	5'-aca ggt acc cca tat act cct gac ctg gt-3'
S-6.2	5'-aca aga tct gac ttg gct tga gtg act ct-3'
S-7	5'-aca ggt acc atg tga tgg cgc aat ctc aga t-3'
S-8	5'-aca aga tct att ata ggc atg agc cac agt g-3'

S-9	5'-aca ggt acc ctg gta cta agc cat caa aac ttg g-3'
S-10	5'-aca aga tct tgt cag tgc tca ctg act gat a-3'
KS-Exon1-2	5'-aca aag ctt tta tcc ctc ctg gcg ttc tct t-3'
KS-9.2Ex	5'-aca aga tct aac tcc aga cct cag gtg att -3'
Mutagenese-Primer	Sequenz
K5mut-DR4-1-1	5'-ata gaa cat ttt att ctc tct gtg ttt tg-3'
K5mut-DR4-1-2	5'-cct ttt ccc aat gac taa gtg ttt gtg -3'
K5mut-DR4-2-1	5'-caa gaa cac aca aac act tag tca ttg g-3'
K5mut-DR4-2-2	5'-aat att cct tca cct ttc ctg tgc ct-3'
K2mut-DR4-1	5'-gcg gaa gga taa ctt ggg gtc agg ag-3'
K2mut-DR4-2	5'-ctt gtt ctc cca agg tgc tgg gat ta-3'
K2mut-DR3-DR4-1	5'-ctt ggg aac agg agt aag aaa cca gcc tgg cca aca t-3'
K2mut-DR3-DR4-2	5'-tta tcc ttc cgc ctt gtt ctc cca agg tgc tgg gat tat ag-3'
Gel-Shift-Oligonukleotide	Sequenz
K2-DR3-1	5'-gat cct ggt ttc aaa ctc ctg acc cca agt a-3'
K2-DR3-2	5'-gat cta ctt ggg gtc agg agt ttg aaa cca g-3'
K2-DR4-1	5'-gat ccg tta tcc acc cgc ctt gac ctc cca a-3'
K2-DR4-2	5'-gat ctt ggg agg tca agg cgg gtg gat aac g-3'
K2-ER8-1	5'-gat ccg gtt ttg aac tcc cag aga tgg aca tct gta -3'
K2-ER8-2	5'-gat cta cag atg tcc atc tct ggg agt tca aaa ccg -3'
K5-DR4-1-1	5'-gat cct aaa atg acc tat cct taa ccc aat ga-3'

K5-DR4-1-2	5'-gat ctc att ggg tta agg ata ggt cat ttt ag-3'
K5-DR4-2-1	5'-gat cct tgt gtg aac ttg aat aaa cct tca ca-3'
K5-DR4-2-2	5'-gat ctg tga agg ttt att caa gtt cac aca ag-3'
SE5-DR4-1	5'-gat cct aac atg tat ttg ttt gac ctc tga ta-3'
SE5-DR4-2	5'-gat cta tca gag gtc aaa caa ata cat gtt ag-3'
SE5-ER8-1	5'-gat cct tgt ttg acc tct gat gat ggg gct gga ata -3'
SE5-ER8-2	5'-gat cta ttc cag ccc cat cat cag agg tca aac aag -3'
SE5-ER6-DR4-1	5'-gat ccg ggg ctg gaa tca tca cag gtc aga ttt a-3'
SE5-ER6-DR4-2	5'-gat cta aat ctg acc tgt gat gat tcc agc ccc g-3'
SE5-DR6-1	5'-gat cca tca cag gtc aga ttt ggg ttc agt caa -3'
SE5-DR6-2	5'-gat ctt tga ctg aac cca aat ctg acc tgt gat g-3'
NS-shift Oligo	5'-agc ttg cga aaa ttg tca ctt cct gtg tac acc ga-3'
K5-DR4-1-1mut	5'-gat cct aaa atg ttc tat cct ttt ccc aat ga-3'
K5-DR4-1-2mut	5'-gat ctc att ggg aaa agg ata gaa cat ttt ag-3'
K5-DR4-2-1mut	5'-gat cct tgt gtg ttc ttg aat att cct tca ca-3'
K5-DR4-2-2mut	5'-gat ctg tga agg aat att caa gaa cac aca ag-3'
K2-DR3-1mut	5'-gat cct ggt ttc tta ctc ctg ttc cca agt a-3'
K2-DR3-2mut	5'-gat cta ctt ggg aac agg agt aag aaa cca g-3'
K2-DR4-1mut	5'-gat ccg tta tcc ttc cgc ctt gtt ctc cca a-3'
K2-DR4-2mut	5'-gat ctt ggg aga aca agg cgg aag gat aac g-3'
K2-ER8-1mut	5'-gat ccg gtt ttg ttc tcc cag aga tgt tca tct gta -3'

K2-ER8-2mut	5'-gat cta cag atg aac atc tct ggg aga aca aaa ccg -3'
ChIP-Primer	Sequenz
SYBR-K5-2 (forward)	5'-gaa aag caa aga cga ggc aaa -3'
SYBR-K5-2 (reverse)	5'-ccc tac ccg ccc cta tca t-3'
SYBR-K5-3 (forward)	5'-cag ttg caa ata ctt atc aaa tgt gtt g-3'
SYBR-K5-3 (reverse)	5'-tgg ttt aac ttc tct gct ctg tag ata ag-3'
SYBR-K5-4 (forward)	5'-agt ttc tac ctg tgc aca tat tta gct t-3'
SYBR-K5-4 (reverse)	5'-tca gtc ttc aaa aca acc ctg aga -3'
SYBR-K2-8 (forward)	5'-ggc ttc ttt gaa gtg gtt ttg aa-3'
SYBR-K2-8 (reverse)	5'-gtg cat ata act gtg cac aca gct -3'
OB-640 (Untr5)	5'-ctg tac ctg g...ttc att -3'
OB-641 (Untr5)	5'-cag taa gcc g...ctc aca -3'
OB-981 (SMPDL3A)	5'-act ctg tga gtc ttc aca cct-3'
OB-982 (SMPDL3A)	5'-ctg aga gga ggc ag gaga gtt-3'
OB-1005 (CYP24A1)	5'-cga agc aca ccc ggt gaa ct -3'
OB-1006 (CYP24A1)	5'-cca atg agc ccg cag agg ag -3'
Untr4 forward	5'-caa gct tgc gtg ggc tgt a-3'
Untr4 reverse	5'-cct gat ccg aag gtc ata gat ttc-3'
Untr20 forward	5'-atc aca ctg caa aaa tcc aga a-3'
Untr20 reverse	5'-tca ctt ctt taa ctg gcc ttg a-3'

Sequenzierungs-Primer	Sequenz
GLp2	5'-ctt aat gtt ttt ggc atc ttc ca -3'
GLp2N	5'-ctt cca tgg tgg ctt tac caa cag -3'
RVp3	5'-cta gca aaa tag gct gtc cc -3'
Intern-K5-Exon1-500bp-forward	5'-gat cga gac tat cct ggc ta-3'
Intern-K5-Exon1-500bp-reverse	5'-tag cca gga tag tct cga tc-3'
Intern-K5-Exon1-1000bp-forward	5'-cca atg gag ata aca ggc tg-3'
Intern-K5-Exon1-1000bp-reverse	5'-cag cct gtt atc tcc att gg-3'

2.5 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Schnittstelle	Firma
Acc65I (10.000 U/mL)	GGTACC	New England BioLabs (NEB)
BamHI (20.000 U/mL)	GGATCC	New England BioLabs (NEB)
BglII (10.000 U/mL)	AGATCT	New England BioLabs (NEB)
HindIII-HF (20.000 U/mL)	AAGCTT	New England BioLabs (NEB)
KpnI-HF (20.000 U/mL)	GGTACC	New England BioLabs (NEB)
MluI (10.000 U/mL)	ACGCGT	New England BioLabs (NEB)

NotI-HF (20.000 U/mL)	GCGGCCGC	New England BioLabs (NEB)
-----------------------	----------	---------------------------

2.6 Antikörper

Antikörper	Finale Konzentration WB/ChIP	Firma/Referenz
Polyclonal Rabbit Anti-mouse Immunglobulins/HRP (secondary Ab) (1,3 g/L)	0,13 µg/mL in 5 % MM-TBST	Dako P0260
Polyclonal swine anti-rabbit IgG7HRP (1,3 g/L)	0,13 µg/mL in 5 % MM-TBST	Dako P0217
Monoclonal Anti-FLAG®, antibody produced in mouse, clone M2 (5µg/µL)	0,5 µg/mL in 1 % MM-TBST / 71 ng/µL	Sigma
Rabbit Anti-ETNPPL (0,5 mg/mL)	0.4 µg/ml in 1% MM-TBST	Sigma prestige Antibodies/Atlas Antibodies
Rabbit anti-PCYT2 pAb (0,8 mg/mL)	0.4 µg/ml in 1% MM-TBST	NovusBio, NBP1-83951
Mouse IgG (1µg/µL)	- / 14 ng/µL	Diagenode
Monoclonal Anti-β-Actin, antibody produced in mouse, clone AC15 (2,8 µg/µL)	0,28 µg/mL in 1% MM-TBST	Sigma

2.7 Genexpressionsassays

Gen	Kontextsequenz	Firma/Referenz	Assay ID
ETNPPL	ACTCCATGCAAAACAAAGATGCTGA	Life Technologies	HS01012280_m1
SEC14L4	GCTGCGAGCTCGAACTTTGACCTG	Life Technologies	Hs00545469_m1
ETNK1	GAGGTGACCCTGCAGCTCTTCACAG	Life Technologies	Hs01071698_m1
ETNK2	GATCAACCCAGCCTTTCTGCAGAT	Life Technologies	Hs00217095_m1
PCYT2	-	Life Technologies	Hs00161098_m1
PCYT1a	CGAACACCGGATTGATTTGTAGCC	Life Technologies	Hs00192339_m1
PCYT1b	ATGGAGCATGGAAGCAGATGTTCCA	Life Technologies	Hs00191464_m1
CEPT1	ACAGAGCAGGCACCTCTGTGGGCAT	Life Technologies	Hs00196061_m1
SMPDL3A	TGACTATTGGCCACAGGATCAACTG	Life Technologies	Hs00378308_m1
CYP3A4	ATTTTGCCTACCATAAGGGCTTTT	Life Technologies	Hs00604506_m1

2.8 Kits

Kit	Firma
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Plasmid Easy Pure	Macherey-Nagel
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega
NucleoSpin® RNA, Mini kit for RNA purification	Macherey-Nagel
iDeal CHIP-qPCR Kit	Diagenode

2.9 Puffer

Puffer	Zusammensetzung	Finale Konzentration
50X TAE	TRIS Base	40 mM
	Eisessig	20 mM
	EDTA pH8	1 mM
Renilla-Assay-Puffer	TRIS-HCl pH 7.8	25 mM
	NaCl	20 mM
	CaCl ₂	1 mM
	Coelenterazin	1 µM
Reaction-Injection-Mix (RIM)	Luciferin	0,05 mM
	ATP	2 mM
	MgCl ₂	10 mM
	Coenzym A	27 µM
	DTT	30 mM
	GlyGly	25 mM
10X Klenow-Puffer	Tris-HCl pH 7.6	0,5 M
	MgCl ₂	0,1 M
	NaCl	0,5 M
TE-Puffer	TRIS-HCl pH 7.8	10 mM
	EDTA pH 8	1 mM

10X TBE	TRIS Base	1 M
	Boric acid	1 M
	EDTA	50 mM
2X Goodwin-Puffer	HEPES (KOH) pH 7.9	20 mM
	KCl	120 mM
	Glyzerin	12 %
	DTT	4 mM
	NP-40	0,4 %
Protein-Lyse-Puffer <i>(Na orthovanadate, Halt Protease Inhibitor und PMSF wurden erst direkt vor Verwendung zugesetzt. Die Lagerung erfolgte ohne diese drei Zusätze bei -20 °C)</i>	HEPES-NaOH pH 7.2	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	NaF	20 mM
	b-glycerophosphate	10 mM
	Triton-X-100	1 %
	Glycerol	10 %
	Natrium butyrat	10 mM
	SDS	0,1 %
	Natrium deoxycholat	0,5 %
	Natrium orthovanadat	2 mM
	Halt Protease Inhibitor	1 x
	PMSF	1 mM

TBS-T	NaCl	137 mM
	KCl	2,68 mM
	TRIS Base	25 mM
	TRIS-HCl	171,32 mM
	TWEEN®-20	0,1 %
5X Laufpuffer (Proteingelelektrophorese)	TRIS Base	125 mM
	Glycin	960 mM
	SDS	0,5%
Blotting-Puffer	TRIS Base	25 mM
	Glycin	192 mM
	Vergälltes Ethanol	20 %
5X Protein Proben Puffer (5X Lämmli)	SDS	10 %
	1M TRIS-HCL pH 6.8	312,5 mM
	2-Mercapthoethanol	25 %
	Glycerol	10 %
	Bromphenolblau	0,1 %
10X MOPS	MOPS	0,2 M
	EDTA	0,01 M
	NaAC	0,05 M
RNA-Farbmarker	Ficoll	10 %
	Bromphenolblau	0,1 %

RNA-Probenpuffer	MOPS	1X
	deion. Formamid	50 %
	Formaldehyd	2,2 M
Smith-Reagenz	Bicinchonic Acid Solution	98 %
	4% Copper(II) sulfate solution	2 %
TE/100 mM NaCl	Tris-Cl pH 7.8	10 mM
	EDTA pH 8	1 mM
	NaCl	100 mM

2.10 Geräte & sonstige Materialien

Geräte	Firma
PCR-Maschine	MJ Research, Inc.
Thermal Cycler, 96-Well, Veriti	Applied Biosystems
E-Box	VWR
CCD-Kamera Stella	Raytest, Straubenhardt, Deutschland
EnSpire® Multimode Plate Reader	PerkinElmer
Fluidigm BioMark HD System	Fluidigm BV, South San Francisco, CA, USA
HIDEX 300 SL Liquid Scintillation Counter	HIDEX
Bioruptor® Standard	Diagenode
7500 Real time PCR System	Applied Biosystems
CR35 Bio Radioluminographie Laserscanner	Raytest, Straubenhardt, Deutschland
UV/Vis-Spektralphotometer NanoDrop™ 200c	VWR, Darmstadt, Deutschland

3500Dx Genetic Analyzer	Applied Biosystems
HERAEUS Multifuge 3SR+ Centrifuge	Thermo Scientific
Sorvall® superspeed RC2-B automatic refrigerated centrifuge	Kendro Laboratory Products
Software	Firma
DNASTAR® EditSeq, GeneQuest, SeqBuilder, SeqManPro Version 14	DNASTAR, Inc.
GraphPad Prism 8	GraphPad
Fluidigm Real-Time PCR Analysis	Fluidigm BV, South San Francisco, CA, USA
SeqA6	Applied Biosystems
Advanced Image Data Analyzer (AIDA) Version 4.50.010	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH
Sonstige Materialien	Firma
PCR Tubes, 0.5 mL	PEQLAB
96-Well Non-Skirted PCR Plate (Sequenzierreaktion)	4titude
FrameStar® 96, with Upstand (TaqMan)	4titude
Mikrotestplatte 96 Well, F	Sarstedt
OptiPlate™ 96, F (weiß/Schwarz)	PerkinElmer
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode	Applied Biosystems
3500 Dx Series Septa 96-Well	Applied Biosystems
TC-Platte 6/12/24 Well, Standard, F	Sarstedt

TC-Schale 100, Standard	Sarstedt
MicroAmp® Optical Adhesive Folie	Applied Biosystems
Biomark™ Gene Expression FlexSix™ IFC/48.48 IFC	Fluidigm
Stripette® 5/10/20/50 mL	Costar® Corning
Röhre 15/50 mL, PP	Sarstedt
Safe Lock Tubes 1.5/2.0 mL	Eppendorf
Combitips advanced 0.1/5/10 mL	eppendorf
10X Phosphate buffered saline (PBS)	Biozym
Cell Lifter, Polyethylen, sterile	Costar® Corning
Ino-Loop Inoculating Loops and Needles, Loop 10 µL, yellow	Simport
Whatman® PROTRAN® Nitrocellulose Transfer Membrane (0,45 µm)	Whatman GmbH
AB-0558 adhesive PCR film	Thermo Scientific
PCR Foil adhesive	Eppendorf
Phosphorimager Platten BAS-IP MS2325	FujiFilm

3 Methoden

3.1 Zelllinie

Für diese Arbeit wurden adhärenenten HepG2 Zellen verwendet. HepG2 sind eine hepatische Zelllinie (HB-8065, Lotnummer 58341723, ATCC, Manassas, VA, USA) die aus dem Hepatoblastoma eines 15-jährigen kaukasischen Jungen generiert wurde (Knowles et al., 1980).

3.2 Zellkultur

Die verwendete Zelllinie wurde alle 3-4 Tage passagiert. Dafür wurde der Zellkulturüberstand verworfen und die Zellen mit 1X PBS gewaschen. Als nächstes wurden die Zellen mit 0,25% Trypsin/EDTA behandelt und für etwa 5 min im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bis sich die Zellen von der Zellkulturschale abgelöst hatten. Durch Zugabe von frischem Medium wurde das Trypsin gestoppt und die Zellen bei Raumtemperatur und 235 x g für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Nach Zellzählung mit dem Hämozytometer, wurde die gewünschte Zellzahl in 6-Well oder 24-Well Platten ausgesät. Die restlichen Zellen wurden in 10cm-Schalen weiter in Kultur gehalten. Die Zelllinie wurde im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt.

3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für das Auftauen von Zellen, wurden diese aus dem Flüssigstickstoff geholt und bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Die aufgetaute Zellsuspension (1 mL) wurde in 9 mL Medium aufgenommen und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und in eine 10 cm Zellkulturschale ausgesät.

Um Zellen einzufrieren, wurden diese wie bereits in 3.2 beschrieben mit 0,25% Trypsin/EDTA behandelt und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und mit der gleichen Menge des HepG2 Einfriermediums tropfenweise unter leichtem Schütteln versetzt. Aufgeteilt in 1 mL Aliquots in sterilen Kryoröhrchen, wurde die Zellsuspension nach mindestens 24-stündiger Lagerung bei -80°C zur Langzeitlagerung in Flüssigstickstoff eingefroren.

3.4 Primäre Hepatozyten

Die primären humanen Hepatozyten (PHH) wurden von der Non-Profit Organisation *human tissue and cell research* (HTCR, Regensburg) zur Verfügung gestellt. Nach schriftlichem Einverständnis der Patienten und mit der Zustimmung der lokalen Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München sowie in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki (Thasler et al., 2003), erfolgte die Probengewinnung aus Leberresektaten von Patienten mit partieller Hepatektomie durch hepacult (München).

Die Zellsuspension wurde auf Eis nach Übernachts-Transport durch sanftes Schwenken aufgewirbelt und in ein 50mL-Tube mit 30 ml kaltem 1X PBS überführt. Das Vial wurde mit 1X PBS ausgespült und ebenfalls in das Tube überführt. Die Probe wurde für 5 min mit 58 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 mL kaltem 1X PBS vorsichtig durch Schwenken resuspendiert. 20 mL kaltes 1X PBS wurden dazupipettiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 mL *full hepatocyte medium* resuspendiert durch Schwenken. Die Zellzahl wurde mittels Erythrosin B Färbung ermittelt und pro Well einer 6-Well Platte wurden 1.2×10^6 Zellen ausgesät. Inkubation der Platten bei 37 °C im Inkubator. Alle 20 min wurde die Platte geschwenkt, um eine bessere Verteilung zu ermöglichen. Nach 5 h wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und durch frisches *full hepatocyte medium* ersetzt.

3.5 Quantitative real time-PCR (Fluidigm)

3.5.1 RNA-Isolierung

Um RNA zu isolieren, wurden 500.000 Zellen pro Well in einer 12-Well Platte ausgesät und für 2-3 Tage in Medium bei 37°C inkubiert. Die Isolierung erfolgte unter Verwendung des *NucleoSpin® RNA, Mini kit for RNA purification*.

Für die Zellyse wurde ein Lyse-Puffer aus 5 mL RA1 und 50 µL β-Mercaptoethanol hergestellt. Nachdem das Medium abgesaugt wurde, wurden die Zellen mit 1 mL 1X PBS gewaschen. Anschließend wurden 350 µL Lyse-Puffer pro Well auf die Zellen gegeben. Mittels eines Zellschabers konnte das viskose Zell-Lysat in 1,5mL-Tubes überführt werden. Nach gründlichem Vortexen und kurzem abzentrifugieren wurden die Proben bei -80°C zwischengelagert.

Für die RNA-Isolierung wurden die eingefrorenen Lysate bei RT aufgetaut. Währenddessen wurde der DNase Reaktionsmix angesetzt aus 90 µL *reaction buffer for rDNase* und 10 µL rekonstituierte rDNase. Der Mix wurde mittels Schnippens gemischt.

Die aufgetauten, gevortexten Lysate wurden auf den NucleoSpin® Filter in einem *2mL-collection Tube* pipettiert und 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Filter verworfen und die homogenisierten Lysate mit je 350 µL 70% EtOH versetzt. Das Gemisch wurde durch auf- und ab-pipettieren vermischt und auf die *NucleoSpin® RNA Column* in einem *2mL-Collection Tube* überführt. Erneut wurde für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend kurz auf einem Papiertuch abgetupft und auf ein frisches *Collection Tube* gesetzt. Je 350 µL MDB-Puffer wurden auf die Säule pipettiert und erneut für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 95 µL des zuvor angesetzten DNase Reaktionsmix auf die Säule gegeben. Die Proben wurden für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden je 200 µL RAW2-Puffer zum DNase Reaktionsmix gegeben und für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Für die weiteren Waschschrte wurden je 600 µL RA3-Puffer auf die abgetupfte Säule pipettiert und erneut 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert, gefolgt von 250 µL RA3-Puffer und einer Zentrifugation von 3 min bei 11.000 x g. Um das restliche EtOH zu entfernen wurde die Säule offen für 3 min bei RT inkubiert. Um die RNA zu eluieren, wurden je 40 µL RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert und für 4 min bei

RT inkubiert. Erneut wurde für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die RNA-Konzentration am NanoDrop gemessen. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

Zur Überprüfung der RNA-Qualität wurde ein 1 % Agarose-Gel in 1X MOPS-Puffer gegossen. 1 µg der RNA-Proben wurde mit dem RNA-Probenpuffer auf 16 µL aufgefüllt und mit 0,5 µg/µL Ethidiumbromid versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 60-65°C wurden die Proben auf Eis abgekühlt, mit 4 µL RNA-Farbmarker versetzt und auf das RNA-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei 125 V für etwa 1 h.

3.5.2 cDNA Synthese

Die RNA Proben wurden auf Eis aufgetaut. RNase-freies Wasser wurde in *PCR-Strips* vorgelegt und RNA dazugegebene, so dass es eine gesamte Masse von 0,32 µg RNA pro *Stripe* in 6,16 µL ergab. Die Proben wurden kurz gevortext und abzentrifugiert.

Mit dem Reaktionsmix wurden die Proben auf 16 µL aufgefüllt. Dieser setzte sich zusammen aus *1X TaqMan RT Buffer*, 5,5 mM MgCl₂, je 0,55 mM *each dNTP Mix*, 2,5 µM *random hexamers*, 0,4 U/µL RNase Inhibitor und 1,25 U/µL *multi scribe reverse transcriptase*.

Durch Schnippen wurden die Proben gemischt und anschließend kurz abzentrifugiert. Die cDNA Synthese wurde im *Thermocycler* gestartet. Dabei wurden die Proben 10 min bei 22 °C inkubiert mit anschließender Inkubation bei 48 °C für 1 h, gefolgt von einer 5-minütigen Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 95 °C.

Die cDNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

3.5.3 pre-Amplifikation

Die synthetisierte cDNA wurde gemeinsam mit den benötigten 20X Genexpressionsassays auf Eis im Dunkeln aufgetaut. Aus den Genexpressionsassays wurde ein 1:100 verdünnter TaqMan-Assay-Pool hergestellt (Final: 0,2X). Außerdem wurde ein Proben-pre-Mix angesetzt aus *1X TaqMan® PreAmp Master Mix* und 0,05X TaqMan-Assay-Pool. 3,75 µL pre-Mix wurde pro Well in eine 384-well Platte vorgelegt, pro cDNA ein Well, und 1,25 µL cDNA dazupipettiert. Die Wells

wurden mit einer Folie gründlich versiegelt und die ganze Platte mit einer weiteren Folie abgedeckt. Nach kurzem Vortexen und abzentrifugieren wurde die Platte in den Thermocycler gestellt und für 10 min bei 95°C inkubiert, gefolgt von 14 Zyklen 15 sek 95°C und 4 min 60°C. Die pre-amplifizierte cDNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

3.5.4 Fluidigm FLEXsix IFC TaqMan Standard Gene Expression Assay

Die pre-amplifizierte cDNA wurde auf Eis aufgetaut und 1:5 mit *Elution Buffer* verdünnt.

Ein 10X Assay-Mix, bestehend aus 1X *Assay loading reagent* und 10X Genexpressionsassay, wurden in einer 96-Well-Platte angesetzt und vor Licht geschützt auf Eis gelagert. In einem weiteren Well der 96-Well-Platte wurde anschließend ein pre-Mix angesetzt aus 1X *PCR Master mix for probe assay* und 5% *GE sample reagent*. Die gesamte Platte wurde mit einer Folie versiegelt, gevortext und kurz abzentrifugiert. Je 2,2 µL des pre-Mix wurden in Wells der gleichen 96-Well-Platte vorgelegt und mit je 1,8 µL pre-amplifizierter, verdünnter cDNA auf 4 µL Gesamtvolumen aufgefüllt. Erneut wurde die Platte versiegelt, gevortext und kurz abzentrifugiert.

Als nächstes wurde der Chip (*Biomark™ Gene Expression FlexSix™ IFC* oder *48.48 IFC*) beladen. Dazu wurden je 3 µL der angesetzten 10X Assay-Mixe in je 3 Wells auf der Assay-Seite des Chips beladen (Triplikate). Auf die Sample-Seite des Chips wurden dann je 3 µL der Proben (cDNA und pre-Mix) in je 1 Well, möglichst Blasen frei, pipettiert. Zur Chipbeladung wurde der Chip in den IFC Controller HX eingelegt und das Protokoll „*load mix(153x)*“ gestartet.

Nach 30 min wurde am Fluidigm die Software „*BioMark™ Data Collection*“ gestartet und die Lampe des Fluidigm vorgekühlt auf -6°C. Sobald der Chip beladen war und die Lampe die Zieltemperatur erreicht hatte, wurde der Chip in den Fluidigm überführt. In der Software wurde die entsprechende sub-Partition ausgewählt (*FlexSix™*), die verwendet wurde und der Speicherort festgelegt. Die Einstellungen für den *Application Type* auf *gene expression* eingestellt, *passive reference* war ROX, der *probe type* wurde als FAM_MGB definiert, *auto exposure* und das *thermal cycling protokoll* „*GE FLEXsix standard v1.pcl*“ ausgewählt. Anschließend wurde der Run gestartet. Nach Ende des Runs wurde der Chip, falls erneut zu verwenden, wieder in den IFC Controller HX eingelegt und das Protokoll „*post run (153x)*“ gestartet.

Die Datenanalyse wurde mittels Fluidigm Real-Time PCR Analysis Software 4.1.3 durchgeführt.

3.6 Proteinpräparation und Analyse

Für die Proteinpräparation wurde der Überstand von den Zellen abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem 1X PBS gewaschen. Anschließend wurde 300 µL eiskalter Protein-Lyse-puffer (Sundqvist et al., 2005) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden im Protein-Lyse-puffer abgekratzt und in 1.5mL-Tubes überführt. Nach Inkubation von 15 min auf Eis wurden die Proben mittels Ultraschall (4 Zyklen à 30 sek ON, 30 sek OFF) im Bioruptor UCD200 homogenisiert. 10 µL der Proteinlysate wurde für die Proteinbestimmung abgenommen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei - 80 °C. Zur Proteinbestimmung wurden die Proteinlysate-Aliquots mit ddH₂O 1:10 oder 1:20 verdünnt. Für die Standardkurve wurde Bovines Serumalbumin (BSA) verwendet. Das Smith-Reagenz wurde aus Bicinchoninsäure und 4 % Kupfer-II-sulfat (1:50) hergestellt. Das Reaktionsprinzip beruht auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ durch Proteinzugabe. Sobald das reduzierte Cu⁺ an die Bicinchoninsäure bindet, ergibt sich eine violette Färbung, deren Intensität proportional zur Proteinmenge ist. Nachdem je 10 µL der Proben in Doppelbestimmung in eine 96-well Plate vorgelegt wurde, wurde je 200 µL Reaktionsreagenz dazugegeben. Die Absorption wurde bei 570 nm nach 1 h Inkubation bei 37 °C am *EnSpire® Multimode Plate Reader* gemessen. Die Proteinkonzentration in µg/µL wurde mittels Standardkurve errechnet.

Für die SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde zuerst das Trenngel gegossen. Dazu wurden 0,39 M Tris-Cl pH8.8 mit 0,1% SDS, 10% Acrylamid/Bis, 0,1% APS und 0,1% TEMED gemischt und mit ddH₂O auf 10 mL aufgefüllt. Um eine glatte Oberfläche zu erhalten, wurde das Trenngel direkt nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet und für mindestens 20 min bei RT unter dem Abzug polymerisieren gelassen. Das Isopropanol wurde nach beendeter Polymerisation wieder entfernt, bevor das Sammelgel auf das Trenngel gegossen wurde. Für das Sammelgel wurden 62 mM Tris-Cl pH6.8 mit 0,1% SDS, 4,5% Acrylamid/Bis, 0,1% APS und 0,1% TEMED gemischt und mit ddH₂O auf 5 mL aufgefüllt, der Kamm eingesteckt und ebenfalls für mindestens 20 min bei RT unter dem Abzug polymerisieren gelassen. 30 µg Protein wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1X Lämmli-Puffer gemischt, der mit 4,8% β-Mercapthoethanol

versetzt war, und mit ddH₂O auf 30 µL aufgefüllt. Die Elektrophorese lief bei 200 V für etwa 50 min.

Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE, wurden diese mittels Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm) geblottet. Dazu wurde das Gel, die Nitrocellulose-Membran, die Filterpapiere und die Fiber-Pads in Blotting Puffer equilibriert und gemäß den elektrischen Polen vom negativen Pol (schwarzen Seite) zum positiven Pol (roten Seite) folgendermaßen aufgeschichtet: Fiber-Pad, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier und Fiber-Pad. Nachdem vorsichtig die Luftblasen ausgestrichen wurden, wurde die Klemmvorrichtung geschlossen und in die Blotting-Kammer gehängt. Für die Temperierung wurde zusätzlich ein -20°C vorgekühlter Kühlakku in die Blotting-Kammer gegeben und diese mit Blotting Buffer bis zur 4-Gele-Markierung gefüllt. Der Western Blot wurde bei 150 V für etwa 30 min gestartet. Zur Überprüfung der Übertragung wurde die Membran in Ponceau-Lösung geschwenkt, bis die Proteinbanden klar zu erkennen waren. Mittels TBS-T wurde die Färbung wieder entfernt und die Membran mit 5% Magermilchlösung, angesetzt aus Magermilchpulver und 1X TBS-T, für 1 h bei RT und schwenken geblockt. Nach erneutem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit primärem Antikörper in 5% Magermilchlösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach 3-maligem Waschen der Membran mit TBS-T für etwa 5 min wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper mit HRP-Konjugat, in 5% Magermilchlösung bei RT im Dunkeln für 1 h rollend inkubiert. Zur Detektion der immunreaktiven Proteinbanden, wurde die Membran in *SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate* für etwa 5 min im Dunkeln inkubiert und anschließend mit dem *STELLA 3200 bio-imaging system* die Lichtintensität aufgezeichnet. Mittels AIDA Auswertesoftware wurden die spezifischen Proteinbanden quantifiziert.

Anschließend wurde die Membran in *Restore™ Plus stripping Buffer* für 30 min bei RT inkubiert, um die Antikörper abzulösen. Nach 3-maligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran erneut mit 5% Magermilchlösung bei RT für 1 h geblockt und anschließend über Nacht bei 4 °C mit primärem β-Aktin Antikörper in 1% Magermilchlösung inkubiert. Die mit TBS-T gewaschene Membran wurde für 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper mit HRP-Konjugat in 5% Magermilchlösung inkubiert. Erneut konnte die Membran mit SuperSignal® Reagenz inkubiert und an der STELLA die Lichtintensität analysiert werden. β-Aktin diente als Ladungskontrolle des Gels.

3.7 *In-silico* Analyse der Kernrezeptor-Bindemotive

Um DNA-Sequenz-Motive zu finden, die potenzielle PXR-Bindemotive enthalten, wurde auf *ensemble.org* die ETNPPL DNA-Sequenz (AC097473.3) bis 10.000 bp oberhalb des ersten Exons, für SEC14L4 die DNA-Sequenz (AC004832.3) bis 15.000 bp oberhalb des ersten Exons und 9768 bp unterhalb des dritten Exons in *DNASTAR EditSeq* kopiert. Mit Hilfe von *DNASTAR GeneQuest* wurde dann gezielt nach den Konsensus-PXR Bindemotiven DR3 (*RGKTCANNNRGKTCA*), DR4 (*RGKTCANNNRGKTCA*), ER6 (*TGAMCYNNNNNRGKTCA*), ER8 (*TGAMCYNNNNNNNRGKTCA*) und IRO (*RGKTCATGAMCY*) gesucht. Die Sequenzabschnitte, in denen innerhalb von 1000 bp die Motive mit der höchsten Übereinstimmung zu den jeweiligen Konsensus-Motiven zu finden waren, wurden herauskopiert. Parallel wurde dieselbe Suche mit *NubiScan* (M. Podvinec; University of Basel, 2021) durchgeführt, der mindest Raw-Score wurde auf 0,7 festgelegt. Elemente mit einem möglichst hohen Raw Score $\geq 0,8$ wurden als potenzielle Bindemotive verzeichnet.

Aus der Zusammenfassung beider Programme wurden die 5 geeignetsten Regionen, mit den vielversprechendsten Bindemotiven, herausgesucht und Primer für diese Regionen entworfen.

3.8 Polymerase-Ketten-Reaktion zur Klonierung der Elemente

Für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden die benötigten 100 μM Primer mit TE-Puffer 1:10 verdünnt.

Ein Master Mix wurde aus 1X *Q5 reaction buffer*, 1X *Q5 high GC enhancer*, 0,2 mM *dNTPs each*, 0,02 U/ μL *Q5 high-fidelity DNA polymerase* agesezt und mit ddH₂O auf 43 μL aufgefüllt. 2 μL genomische DNA (Final: etwa 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), beziehungsweise ddH₂O als Kontrolle, wurde in *PCR-Tubes* vorgelegt und je 0,5 μM Primer (Forward und Reverse) dazupipettiert. Mit dem Master Mix wurden die Proben auf 50 μL aufgefüllt und alles durch Schnippen gemischt und abzentrifugiert. Die PCR wurde im PCR-Cycler gestartet:

98 °C	30 sek	
98 °C	10 sek	29x
56-70 °C	30 sek	
72 °C	45 sek	
72 °C	2 min	
21 °C	hold	

Die Annealing-Temperatur (56-70 °C) musste für die jeweiligen Primerpaare angepasst werden, die mittels *TM Calculator* berechnet wurde. Anschließend wurden je 5 µL Probe aliquotiert für die Kontrolle mittel Agarose-Gel-Elektrophorese.

Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

3.9 Agarose-Gel-Elektrophorese zur Überprüfung und Aufreinigung der Konstrukte

Je nach Agarosekonzentration des Gels (0,7-1,5 %) wurde *Ultrapure™ Agarose* in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und mit 1X TAE Puffer versetzt. Um die Agarose zu lösen, wurde das Gemisch in der Mikrowelle bei 800 Watt erhitzt und anschließend in einem Wasserbad auf ca. 60°C abgekühlt. Nach Zugabe von 2-4 Tropfen 0,025% Ethidiumbromid-Lösung wurde die Lösung in den Gelschlitten gegossen, die Luftblasen entfernt und der Kamm eingesetzt. Das Gel war nach etwa 20 min ausgehärtet.

Die Proben wurden mit 6x *Purple Gel Loading Dye* (Final: 1X) versetzt und parallel zum *1kb PLUS DNA Ladder* beziehungsweise *50bp DNA Ladder* in die Taschen des Gels aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei 125V für 30-60 min laufen gelassen

3.10 Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau wurde ein Master Mix aus dem Enzym-Puffer, 10X CutSmart oder NEBuffer 3.1 (Final: 1X), 5-10 U/ μ L Restriktionsenzym 1 und 5-10 U/ μ L Restriktionsenzym 2, aufgefüllt auf 10 μ L mit ddH₂O angesetzt. Anschließend wurden 10 μ L der Probe mit 10 μ L Master Mix gemischt und bei 37°C im Wasserbad für etwa 2h inkubiert.

Der Restriktionsverdau wurde mittels Agarose-Gel-Elektrophorese (siehe 3.9) überprüft.

3.11 Vektorpräparation

Die Leervektoren für die Ligation mit dem gewünschten Insert, wurden mit denselben Restriktionsenzymen (5-10 U/ μ L) verdaut, wie das Insert.

Anschließend wurden die Restriktionsenzyme hitzeinaktiviert für 20 min bei 65-80°C. Nach der Inaktivierung wurden dem 20 μ L Ansatz der verdauten DNA 3 μ L 10X *antarctic phosphatase Buffer* und 1 μ L 5 U/ μ L *antarctic phosphatase* zugesetzt und mit ddH₂O auf 30 μ L aufgefüllt. Die Probe wurde für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend die Phosphatase für 5 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

Die Probe wurde mit einer Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und anschließend aufgereinigt, siehe 3.12.

Die Lagerung des fertigen Vektors erfolgte bei -20°C.

3.12 Agarose-Gel Aufreinigung

Nach der Agarose-Gel-Elektrophorese wurden die gewünschten Insert-Banden beziehungsweise Vektor-Banden (Vektorpräparation) aus dem Gel ausgeschnitten und mit einer Feinwaage gewogen. Die Aufreinigung wurde dann mittels *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* durchgeführt.

Dabei wurde das doppelte Volumen, bezogen auf das Gelgewicht, an *NTI* zu den Agarose-Gel-Stücken gegeben und bei 50 °C im Thermoblock erwärmt, bis die Stücke gelöst waren (ca. 5 min). Sobald die Gel-Stücke vollständig gelöst waren, wurde die Lösung auf die *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column* in einem *2mL-Collection Tube* pipettiert und für 1 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Je 700 µL *Wash Buffer NT3* wurden auf die Membran pipettiert und für 1 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Erneut wurde der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde anschließend leer für 3 min bei 14.000 x g zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Danach wurde die Säule auf ein frisches 1,5mL-Tube transferiert und 32 µL *Elution Buffer NE* auf die Membran gegeben. Die Säule wurde für 2 min bei RT inkubiert und anschließend für 1 min bei 14.000 x g zentrifugiert.

Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

3.13 Ligation der gesuchten Inserts mit dem Leervektor

15 µL des aufgereinigten Inserts aus 3.12 wurden zusammen mit 2 µL dephosphoryliertem Leervektor (pGL3/pGL4) aus 3.11/3.12, 2 µL 10X Ligation Buffer (Final: 1X) und 1 µL T4 DNA-Ligase (1 U/µL) vermischt (finales Volumen: 20 µL) und über Nacht bei ca. 15 °C im Eiswasserbad inkubiert. Lagerung der Proben bei -20°C.

3.14 Transformation kompetenter Zellen

Kompetente TOP 10F' Zellen wurden auf Eis aufgetaut, anschließend mit 4 µL des Ligationsansatz versetzt und durch leichtes Schnippen gemischt. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 42°C für 50 sek inkubiert, gefolgt von 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 250 µL SOC-Medium wurden die Zellen bei 37 °C auf der *Roller Drum* für 1h inkubiert. Je 150 µL der Zellsuspension wurden auf eine LB-Agar Platte mit Ampicillin pipettiert und mit einer Impföse gleichmäßig verstrichen. Alternativ wurden 100 µL Zellsuspension direkt in einem

Erlenmeyerkolben (siehe 3.17) mit 50 mL LB-Medium mit Ampicillin angeimpft. Die Platten wurden auf Kopf über Nacht bei 37 °C inkubiert, die Kolben unter Schütteln ebenfalls.

Ultrakompetente XL10-Gold Zellen sind besonders für die effiziente Transformation von großen DNA-Molekülen geeignet. Sie wurden für die Transformation der S4-Region des SEC14L4-Gens verwendet.

Dazu wurden die XL10-Gold Zellen (100 µL Aliquot) auf Eis aufgetaut. Das Aliquot wurde auf 2X 50 µL aufgeteilt und in vorgekühlte 1,5mL-Tubes überführt. Je 2 µL 2-Mercaptoethanol wurden dazupipettiert und das vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde alle 2 min vorsichtig gemischt. Zu der Zellsuspension wurden 4,5 µL der ligierten Probe pipettiert und vorsichtig gemischt. Auf Eis inkubierten die Zellen für 30 min. Für den Hitzeschock wurden die Zellen für 30 sek bei 42 °C und anschließender für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 450 µL vorgewärmtem SOC-Medium (42 °C) wurde die Zellsuspension für 1 h bei 37 °C rotierend inkubiert. Je 200 µL der Zellsuspension wurden auf eine LB-Agar Platte mit Ampicillin pipettiert und mit einer Impföse gleichmäßig verstrichen. Nach 10 min bei RT zum Trocknen, wurden die Platten auf Kopf über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.15 DNA-Präparation

2-20 Klone der transformierten Zellen wurden mit einem sterilen Zahnstocher von der LB-Agar Platte gepickt und über Nacht in jeweils 2 mL LB-Medium mit Ampicillin in einem Reagenzglas auf der *Roller Drum* bei 37°C inkubiert.

Die Aufarbeitung am nächsten Tag wurde mittels *NucleoSpin® plasmid easy pure* Kit durchgeführt. Die Zellsuspension wurde in ein 2mL-Tube überführt und für 1 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in den Bakterienabfall abpipettiert und das Pellet in 150 µL *resuspension buffer A1* mit RNase resuspendiert. Anschließend wurden 250 µL *lysis buffer A2* dazu gegeben und durch starkes Schütteln vermischt (blaue Färbung). Die Mischung wurde bei RT für 2 min inkubiert. 350 µL *neutralisation buffer A3* wurden dazugegeben und erneut stark geschüttelt (entfärbt). Anschließend wurde für 3 min bei 14.000 x g zentrifugiert und der Überstand auf die

NucleoSpin® column überführt. Erneut wurde für 1 min bei 14.000 x g zentrifugiert, die Membran mit 450 µL *wash buffer AQ* versetzt und erneut zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule im Anschluss für eine weitere Minute bei 14.000 x g trocken zentrifugiert.

Die Säule wurde dann in ein frisches 1,5mL-Tube überführt und die Membran mit 50 µL *elution buffer AE* versetzt. Nach einer Inkubation von 1 min bei RT wurde die Säule erneut für 1 min bei 14.000 x g zentrifugiert und die DNA-Konzentration am NanoDrop bestimmt.

Zur Kontrolle wurde mit 500 ng DNA ein geeigneter Restriktionsverdau (siehe 3.10) mit anschließender Agarose-Gel-Elektrophorese (siehe 3.9) durchgeführt.

3.16 Sequenzierung der verschiedenen Klone zur Sequenzüberprüfung

Für die Sequenzierreaktion wurde ein Master Mix aus 1 µL *5X Big Dye® terminator sequencing buffer*, 0,32 µL 10 pmol/µL Primer, 2 µL *3.1 Big dye® terminator premix* angesetzt und mit ddH₂O auf 10 µL aufgefüllt. 600 ng DNA wurden mit Master Mix auf 10 µL aufgefüllt. Der Master Mix wurde in die PCR-Platte vorgelegt und die Platte nach Zugabe der DNA mit einer Folie versiegelt.

Nach kurzem Abzentrifugieren wurde das PCR-Programm gestartet:

96 °C	1 min	
96 °C	10 sek	25x
55 °C	10 sek	
60 °C	4 min	
4 °C	hold	

Für die Aufreinigung der Proben wurde die Folie von den verwendeten Wells entfernt. Die Proben wurden mit je 1 µL 3 M Natriumacetat pH 5.2 versetzt und die Wells mit Deckelreihen verschlossen. Nach gründlichem vortexen und kurzem abzentrifugieren wurden je 25 µL eiskalter absoluter EtOH dazupipettiert und die Wells wieder verschlossen. Erneut wurde gevortext und abzentrifugiert. Die Proben wurden anschließend bei -80°C für 30 min oder alternativ bei -20 °C für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben für 35 min bei 4400 rpm (Sorvall 75006445

Rotor, Durchmesser: 159 mm) bei 16 °C zentrifugiert (gründlich austariert). Um den EtOH zu entfernen wurde die Platte kurz (2 min bei 2000 rpm (Sorvall 75006445 Rotor, Durchmesser: 159 mm)) auf Kopf zentrifugiert und die Deckelreihen entfernt. Die Platte wurde offen für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben in 10 µL LiChrosolv® Wasser (*LC-MS grade*) gelöst. Dazu wurden nach Zugabe des Wassers die Proben gevortext und kurz abzentrifugiert, gefolgt von 5 min Inkubation bei RT, erneutem vortexten und abzentrifugieren.

Die Proben wurden bei -20°C zwischengelagert.

Für die Sequenzierung wurden die gereinigten Proben auf Eis aufgetaut und gründlich gevortext. Je 5 µL der Proben wurde in eine *MicroAmp® optical 96-well reaction plate with barcode* pipettiert und jeweils mit 15 µL Sequenzierwasser versetzt. Die Platte wurde mit *SEPTA 96-well 3500 DX series* verschlossen und gründlich gevortext.

Anschließend wurde die Sequenzierung gestartet:

- Die Platte wurde in den Halter eingespannt
- Mit „Tray“ wurde das Gerät geöffnet und die eingespannte Platte eingelegt
- Software „3500Dx“ geöffnet und „start pre-heat“ angeklickt
- „create new plate“ → Platte bzw. Run benennen → “assign plate content”
- Wells wurden beschriftet
- “assay” → “add from library” → “Std_Seq_Assay_POP7” (BDTv3.1_PA_Protocol-POP7) → “add to plate”
- “file name convention” → “add from library” → “Well Position_SampleName” → “add to plate”
- “results groups” → “add from library” → “Seq_PlateName”
- Alle Proben markiert und Haken für alle 3 setzten
- „link plate for run“
- Run bzw Platten Name anpassen
- „start run“

Nach Ende der Sequenzierung wurden die Daten mit der *SeqA6* Software analysiert und mit *DNASTAR SeqMan Pro* ausgewertet.

3.17 Midi-Plasmid-Präparation

Nach erfolgreicher Sequenzierung wurde jeweils ein korrekter Klon ausgewählt (keine Variationen, vollständige Übereinstimmung mit der Referenzsequenz) und die restliche Zellsuspension aus der Inokulation (siehe 3.15) für die DNA-Präparation in 50 mL LB-Medium mit Ampicillin in einem 250 mL Erlenmeyerkolben über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Aufarbeitung am nächsten Tag erfolgt mittels *PureYield™ plasmid midiprep system*. Die Zellsuspension wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 5.500 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in den Bakterienabfall entsorgt. Das Pellet wurde in 3 mL *cell resuspension solution* (CRA) resuspendiert und direkt in ein 30mL-Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden 3 mL *cell lysis solution* (CLS) dazugegeben und stark geschüttelt. Nach einer Inkubation von 3 min bei RT wurden je 5 mL *neutralization solution* (NSB) dazupipettiert und erneut stark geschüttelt. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 11.500 Upm wurde der Überstand in eine blaue *clearing column* auf der weißen *binding column* überführt. Mittels Vakuums wurde der Überstand durch beide Säulen gefiltert. Die blaue *clearing column* wurde verworfen. Anschließend wurden je 5 mL *endotoxin removal wash* in die weiße *binding column* pipettiert und wieder Vakuum angelegt. Danach wurden 20 mL *column wash solution* auf die Säule pipettiert und erneut Vakuum angelegt. Um die Membran zu trocknen, wurde das Vakuum für eine weitere Minute angelassen bevor die Säule auf den *Eluator™ vacuum elution device* mit 1,5mL-Tube überführt wurde. Je 600 µL Nuklease freiem Wasser wurden auf die Membran pipettiert und die Säule für 5 min bei RT inkubiert, bevor erneut Vakuum für 1 min angelegt wurde.

Die DNA-Konzentration wurde am NanoDrop bestimmt.

Anschließend wurden die Proben mit *nuclease-free water* auf eine Konzentration von 0,5 µg/µL beziehungsweise 0,25 µg/µL eingestellt und bei -20°C gelagert.

Zu Kontrolle der Proben wurde ein geeigneter Restriktionsverdau von 0,5 µg DNA (siehe 3.10) mit anschließender Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt (siehe 3.9).

3.18 Reportergeren Assay zur Untersuchung der Aktivität der Elemente

3.18.1 Transiente Transfektion von HepG2-Zellen mit JetPRIME

Für die Transfektion wurden 24 h vorher $1,5 \times 10^5$ HepG2 Zellen pro Well einer 24-Well Platte ausgesät.

Am Folgetag wurde je Ansatz ein Master-Mix aus 0,3 µg Reportergenplasmid (ETNPPL/SEC14L4), 0,01 µg Renilla-Luciferase Normalisierungsplasmid pGL4.75(hRluc/CMV), 0,02 µg PXR-Expressionsplasmid oder pcDNA3 Leervektor, 0,02 µg RXR-Expressionsplasmid, 0,15 µg pUC18 Plasmid-DNA zum Auffüllen hergestellt und mit *jetPRIME buffer* auf 50 µL aufgefüllt. Nach gründlichem Mischen wurde je 1 µL *jetPRIME transfection reagent* hinzugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Je 51 µL Master-Mix wurde pro Well pipettiert. Nach der tropfenweisen Zugabe wurden die transfizierten Zellen bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die transfizierten Zellen mit 10 µM Rifampicin oder 0,1% DMSO behandelt und erneut für 24 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

3.18.2 Leuchtkäfer/Renilla-Luciferase-Assays

Nach 24 h Inkubation mit Rifampicin wurde der Zellkulturüberstand verworfen und die Zellen mit 1X PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 150 µL 1X *Passive Lysis Buffer* für mindestens 20 min unter Schütteln lysiert. Die lysierten Zellen wurden in eine 96-Well Platte überführt und bei 440 x g für 5 min abzentrifugiert, um ein klares Lysat zu erhalten.

Je 10 µL des Überstandes wurden mit einer Multikanalpipette in eine weiße 96-Well *OptiPlate* überführt. Mittels Multipette wurden in jedes Well 150 µL RIM gegeben und für 10 min unter Schütteln bei RT inkubiert. Gemessen wurde die Lumineszenz (0,1 sek) am *EnSpire® multimode plate reader*. Anschließend wurden erneut 10 µL in eine andere weiße 96-Well *OptiPlate* pipettiert und pro Well 100 µL Renilla-Assay Puffer zugesetzt. Die Platte wurde ebenfalls für 10 min unter Schütteln bei RT inkubiert und anschließend im *EnSpire®* die Lumineszenz gemessen.

Für die Auswertung wurden die Messwerte der Renilla-Messung als Normalisierung für die Luciferase-Messung verwendet (LUC/REN).

3.19 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) der potenziellen PXR-Bindestellen aus den Rifampicin-induzierten Konstrukten

Mit dem *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) wurde die Bindung eines Proteins an die DNA gezeigt. Dabei wurde die DNA radioaktiv markiert und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Wenn ein Protein an die DNA gebunden vorlag, zeigte sich ein anderes Laufverhalten im Vergleich zur ungebundenen DNA. Dadurch konnte eine DNA-Protein-Bindung *in vitro* nachgewiesen werden.

3.19.1 Hybridisierung der einzelsträngigen Gel-Shift-Oligonukleotide

Die korrespondierenden einzelsträngigen Oligonukleotide der gewünschten DNA-Sequenzen mit dem wildtypischen Rezeptorbindemotiv oder dem mutierten wurden für die EMSA zu Doppelsträngen hybridisiert.

Dazu wurden je 10 µL 100 µM Primer mit 10X Klenow-Puffer und 170 µL ddH₂O versetzt und für 10 min in kochendem Wasser inkubiert. Anschließend wurden die Proben langsam mit dem Wasserbad abkühlen gelassen, in dem nur die Heizplatte ausgeschaltet wurde.

Die hybridisierten doppelsträngigen Oligonukleotide wurden bei -20 °C gelagert.

3.19.2 *In vitro* Transkription/Translation zur Proteinbiosynthese

Die benötigten Proteine wurde durch gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation (TNT) der Expressionsplasmide pcDhuPXR, pcDhuXRa(orf) oder pcDNA3 mit dem *TNT[®] T7 quick master mix* hergestellt. Dazu wurde der *TNT[®] T7 quick master mix* aus -80 °C zügig per Hand aufgetaut und auf Eis gelagert.

40 μL des Master Mix wurden mit 1 μL 1 mM Methionin, 2 μL des 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Expressionsplasmid und 7 μL ddH₂O durch Schnippen vermischt. Die Proben wurden bei 30 °C im Wasserbad für 90 min inkubiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

Übrig gebliebener *TNT® T7 quick master mix* wurde zügig mit Flüssigstickstoff wieder eingefroren und sofort wieder bei -80 °C gelagert.

3.19.3 Radioaktive Markierung der Hybridisierten Doppelstränge & Reinigung

Die zuvor hybridisierten Proben wurden mit Klenow-Puffer und d(GAT)P auf Eis aufgetaut. Ein Master mix wurde aus 5 μL 10X Klenow-Puffer und 5 μL 2 mM d(GAT)P angesetzt und mit ddH₂O auf 44,5 μL aufgefüllt. Nach gründlichem vortexen und abzentrifugieren, wurden die Proben ins Isotopenlabor überführt und dort mit 25 μCi radioaktivem $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol, radioaktive Konzentration 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$) versetzt. Erneut wurde gevortext und abzentrifugiert. Zum Schluss wurde 1 μL 2 U/ μL Klenow-Enzym dazugegeben und durch vorsichtiges Schnippen gemischt.

2 μL der hybridisierten Proben wurde in 1,5mL-Tubes vorgelegt und mit 48 μL Master Mix durch auf- und ab-pipettieren gemischt. Die Proben wurden anschließend bei 37 °C im Wasserbad für 1 h inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Proben über *Illustra™ ProbeQuant™ G-50 micro columns* aufgereinigt.

Dazu wurden die Säulen vor Gebrauch gründlich gevortext. Anschließend wurden der Deckel leicht geöffnet, die Spitze abgebrochen und in 1,5mL-Tubes überführt. Nach einer Zentrifugation bei 735 x g für 1 min, wurden die Säulen in frische 1,5mL-Tubes überführt und die radioaktiv markierten Proben mittig auf die Membran aufgetropft. Erneut wurde für 2 min bei 735 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule im radioaktiv-Abfall entsorgt. Das Eluat enthält die radioaktiv markierte Probe.

Die Proben wurden gevortext und abzentrifugiert. Je 1 μL der Probe wurde in ein 7mL-Vial überführt und mit 5 mL *Aquasafe 300+* versetzt.

Mit dem *Hidex 300 SL liquid scintillation counter* wurden die Proben gemessen und anschließend auf 50.000 cpm/ μ L mit TE/100mM NaCl-Puffer eingestellt.

Die Proben wurden bei 4 °C im Isotopenlabor gelagert.

3.19.4 Gel-Shift-Assay mit in vitro synthetisiertem Protein

Zu Beginn wurde ein 5% Polyacrylamid-Gel hergestellt. Dazu wurden 0,5X TBE-Puffer, 5% Acrylamide/Bis, 0,1% APS und 0,1% TEMED gemischt und mit ddH₂O auf 30 mL aufgefüllt. Die benötigten zwei Glasplatten wurden mit vergälltem EtOH gereinigt und ein angefeuchtetes Dichtungsgummi um die unteren Kanten einer der Platten gelegt. Die zweite Platte wurde oben daraufgelegt und mit je 2 Klammern pro Seite befestigt. An den Seiten wurden Platzhalter (Spacer) eingefügt. 2 zusätzliche Klammern wurden als Ständer verwendet.

Etwa 30 mL Ansatz für das Gel wurde in die Kammer pipettiert und vorsichtig der Kamm eingesteckt, wobei die überschüssige Flüssigkeit mit einem Tuch aufgefangen wurde. Das luftblasenfreie Gel wurde für 45 min bei RT polymerisieren gelassen.

Währenddessen wurde der Master Mix für die Bindungsreaktion vorbereitet. Dazu wurden 10 μ L 2X Goodwin-Puffer mit 2 μ L 10 μ M NS-einzelsträngiges Oligonukleotid gemischt und mit ddH₂O auf 15 μ L aufgefüllt. Je 15 μ L davon wurden in die Tubes vorgelegt.

Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde der Dichtungsgummi entfernt und die restliche Flüssigkeit mit einem Tuch aufgefangen. Der Kamm wurde vorsichtig herausgezogen und die Kammer von außen mit H₂O gereinigt. Das überschüssige Gel wurde mit einem Skalpell entfernt. Anschließend wurde das Gel im Isotopenlabor luftblasenfrei in die Elektrophoresekammer mit 0,5X TBE-Puffer gestellt und mit Klammern eingespannt. Die Taschen wurden mit 0,5X TBE ausgespült und die gesamte Elektrophoresekammer in den Kühlschrank (4 °C) gestellt.

Die vorbereiteten TNT-Proteine wurden aus -80 °C geholt und mit der Hand aufgetaut. In Summe wurden je 4 μ L TNT-Protein pro Probe (3 μ L RXR, 1 μ L PXR oder 1-4 μ L pcDNA3 als Negativkontrolle) zum Master Mix der Bindungsreaktion pipettiert und durch Schnippen gemischt. Die Proben inkubierten für 15 min auf Eis.

Währenddessen wurde der Gel-Vorlauf gestartet bei 200 V für 30 min im Kühlschrank (4 °C).

Im Isotopenlabor wurde nach der Inkubation je 1 μL der radioaktiv markierten Probe (= 50.000 cpm) zu den TNT-Proteinen mit Master Mix pipettiert und erneut für 20 min auf Eis inkubiert (Bindungsreaktion).

Nachdem der Gel-Vorlauf gestoppt wurde, wurden die Taschen erneut mit 0,5X TBE-Puffer ausgespült und anschließend das Gel mit den Proben und parallel zum *1X purple loading dye* beladen. Die Elektrophorese wurde für 2 h 30 bei 200 V im Kühlschrank (4 °C) laufen gelassen.

Nachdem die Elektrophorese gestoppt wurde, wurden die Klammern entfernt und die Gel-Kammer entnommen. Die Platzhalter wurden entfernt und die Gel-Kammer auseinander gedrückt. Das Gel wurde mit Whatman-Paper aufgenommen und auf ein zweites Whatman-Paper in den Geltrockner überführt. Das Gel wurde mit einer Frischhaltefolie abgedeckt und der Geltrockner geschlossen. Für mindestens 30 min wurde das Gel bei 80 °C getrocknet.

Währenddessen wurde die *Phosphorimager Platten BAS-IP MS2325* mit Licht für 20 min gelöscht. Das getrocknete Gel wurde in eine bleiummantelte Kassette geklebt und die Phosphorimager Platten mit der weißen Seite auf das Gel gelegt.

Die Exposition erfolgt über Nacht oder für mehrere Tage und wurde mittels *CR35 Bio Radioluminographie Laserscanner* und der AIDA Software quantifiziert.

3.19.5 Kompetitions-Gel-Shift Assay

Der Kompetitions-Gel-Shift Assay wurde genauso durchgeführt wie der Gel-Shift-Assay (siehe 3.19.4) mit TNT-Protein. Abweichend vom obenstehenden Protokoll wurden in diesem Assay noch Kompetitoren dazugefügt. Diese Kompetitoren waren die mit TE/100mM NaCl verdünnten unmarkierten doppelsträngigen Oligonukleotide mit einem molaren Überschuss von 5-fach, 25-fach oder 125-fach im Vergleich zur radioaktiv-markierten Probe, die die jeweiligen Bindungsstellen beziehungsweise mutierten Bindestellen enthielten.

Nach Zugabe der TNT-Proteine wurde zu den jeweiligen Ansätzen noch je 1 μL des dazugehörigen unmarkierten Kompetitors dazupipettiert, bevor die markierten Oligonukleotide dazugegeben wurden.

3.20 Mutagenese der Plasmide

Um die PXR Bindemotive zu mutieren, wurden spezielle Primer mit Hilfe des *NEBaseChanger*[®] entworfen. Mit diesen Primern wurde ein Master mix angesetzt aus *1X Q5 hot start high fidelity 2X master mix*, je 0,5 µM Primer und 2,5 ng/µL genomischer DNA, aufgefüllt mit Nuklease freiem Wasser auf 25 µL. Die PCR wurde gestartet wie in 3.8 beschrieben.

Nach der PCR, wurde eine Kinase, Ligase, DpnI (KLD) Behandlung mit einem Teil der PCR-Probe durchgeführt. Dazu wurden 1 µL PCR-Produkt mit 5 µL *2X KLD reaction buffer*, 1 µL *10X KLD enzyme mix* und Nuklease freiem Wasser angesetzt (Endvolumen 10 µl) und durch Schnippen gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Mit den KLD-behandelten PCR-Ansätzen, wurde eine Transformation durchgeführt wie in 3.14 beschrieben. Abweichend zum obenstehenden Protokoll, wurden die kompetenten Zellen nach Zugabe der Probe für 30 min auf Eis inkubiert und nach dem Hitzeschock mit 950 µL SOC-Medium versetzt. Außerdem wurde die Zellsuspension vor dem Ausplattieren zum Teil 1:10 mit SOC-Medium verdünnt.

Die so transformierten Zellen wurden für die DNA-Präparation, siehe 3.15, verwendet und mittels Sequenzierung, siehe 3.16, die erfolgreiche Mutagenese überprüft. Anschließend wurde eine Midi-Plasmid-Präparation, siehe 3.16, durchgeführt und die Expressionslevel der mutierten Regionen durch einen Reportergen Assay, siehe 3.18, überprüft.

Für eine Doppelmutation der Bindemotive, wurde erst das eine Element mutiert und nach erfolgreicher Sequenzierung mit der bereits präparierten DNA das zweite Element mutiert.

3.21 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunpräzipitation wurde zur Validierung der mittels EMSA identifizierten *in vitro* DNA-Protein-Interaktionen durchgeführt.

3.21.1 Zellgewinnung und DNA-Protein-Quervernetzung

3x 10⁶ HepG2 Zellen wurden in je eine 10cm-Schale ausgesät und nach 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ mit humanem PXR oder pcDNA3 transfiziert. Dazu wurden 25 µL des *x-treme GENE HP DNA Transfection Reagent* (Roche) mit 980 µL MEM ohne Zusätze und 20 µL der entsprechenden Plasmid-DNA (0,5 µg/µL) vermischt, für 30 min bei RT inkubiert und 1025 µL tropfenweise pro 10cm-Schale auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 24 h Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit 10 µM Rifampicin oder 0,1% DMSO als Kontrolle für 3 h bei 37 °C und 5% CO₂ behandelt.

Zur Kontrolle der finalen Zellzahl wurden die Zellen einer der ausgesäten 10cm-Schalen mit 0,25% Trypsin/EDTA abtrypsinisiert und im Hämocytometer die Zellzahl bestimmt. Die hier verwendeten Zellen wurden anschließend in die normale Zellkultur überführt.

Ab diesem Schritt wurde nach dem Protokoll des *iDeal CHIP-qPCR kit* vorgegangen.

Dazu wurden die mit Rifampicin und DMSO behandelten 10cm-Schalen unter dem Abzug mit 1 mL *Fixation Buffer* + Formaldehyd (Final in der Platte: 1%) versetzt und für 10 min bei RT unter Schütteln bei 100 rpm inkubiert. Um die Fixierung zu stoppen, wurden je 1,1 mL Glyzin (Final: 10%) dazu pipettiert und für 5 min bei RT unter Schütteln bei 100 rpm inkubiert.

3.21.2 Zelllyse und Chromatinfragmentierung

Der, das Formaldehyd enthaltende, Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit 20 mL 1X PBS gewaschen. Ab diesem Schritt erfolgte alles auf Eis.

Auf die Zellen wurden 5 mL *Lysis Buffer iL1b* gegeben, mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein 50mL-Röhrchen überführt. Anschließend wurde die Suspension mit *Lysis Buffer iL1b* auf 1 mio Zellen/mL aufgefüllt. Die darauffolgende Inkubation erfolgte bei 4 °C für 20 min mit über-Kopf-Rotation. Nach Zentrifugation bei 500 x g für 5 min bei 4 °C wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 mL kaltem *Lysis Buffer iL2* resuspendiert und mit *iL2* auf 15 mL aufgefüllt. Erneut wurden die Proben bei 4 °C für 10 min mit über-Kopf-Rotation inkubiert. Der Überstand wurde nach erfolgter Zentrifugation bei 500 x g für 5 min bei 4 °C verworfen und das Pellet in 1,68 mL *Shearing Buffer iS1b* resuspendiert, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation auf Eis.

Für die Fragmentierung wurden die Proben in Aliquots mit 100-300 μL in *TPX-Tubes* aufgeteilt und für 23 Zyklen im Bioruptor® UCD200 auf High sonifiziert. Die Wasserbadtemperatur wurde regelmäßig überprüft und unter 8 °C gehalten. Nach erfolgter Fragmentierung wurden die Proben kurz abzentrifugiert und in ein frisches 2mL-Tube gepoolt. Der Überstand nach erfolgter Zentrifugation bei 16.000 x g für 10 min bei 4 °C wurde in ein frisches 1,5mL-Tube überführt.

Zur Beurteilung der Fragmentierung wurde ein 50 μL -Aliquot entnommen und nach dem Protokoll des *Chromatin EasyShear Kit- Low SDS* bearbeitet.

Dazu wurde das 50 μL -Aliquot mit 2 μL 0,67 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ RNase A versetzt (angesetzt aus 100 mg/mL RNase A in ddH₂O) und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden je 50 μL *Elution Buffer iE1* und je 4 μL *Elution Buffer iE2* dazugegeben und über Nacht bei 65 °C bei 700 rpm im Thermoblock inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben mit je 106 μL Phenol-Chloroform-Isoamyl Alkohol 25:24:1 versetzt und bei 16.000 x g für 2 min bei RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig in ein frisches 1,5mL-Tube überführt und das Volumen bestimmt. Das gleiche Volumen wurde an Chloroform-Isoamyl Alkohol 24:1 dazugegeben und erneut bei 16.000 x g für 2 min bei RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein frisches 1,5mL-Tube überführt und mit je 10 μL *DNA-precipitant*, 5 μL *DNA co-precipitant* und 500 μL 100% Ethanol versetzt. Nach einer Inkubation bei – 80 °C für 30 min wurden die Proben bei 16.000 x g für 25 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit je 500 μL 70% kaltem Ethanol gewaschen und zentrifugiert (16.000 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei RT für 10 min getrocknet (wird durchsichtig). Mit 20 μL *TE Buffer* wurde das Pellet resuspendiert und mit 4 μL *6x Purple loading dye* versetzt. Die Proben wurden auf ein 1,5%-iges Agarose-Gel aufgetragen und bei 100 V für 40 min die Elektrophorese gestartet. Die Proben bildeten Banden-Wolken im Bereich von 100-600 bp.

3.21.3 Immunpräzipitation

Vor Beginn der Immunpräzipitation (IP) wurde der *5X CHIP Buffer iC1b* auf 1X verdünnt. Dazu wurden für 4 mL 3,2 mL *CHIP-seq grade water* mit 0,8 mL *5X CHIP Buffer iC1b* und 80 μL 5% BSA gemischt und auf Eis vorgekühlt.

30 μL *DiaMag Protein A-coated magnetic beads* pro IP wurden entnommen und in ein frisches 1,5mL-Tube überführt. Die Beads wurden dreimal mit 1 mL eiskaltem 1X ChIP Buffer iC1b gewaschen. Dazu wurde die Beadsuspension in dem Puffer durch auf- und ab-pipettieren resuspendiert und 5-mal invertiert. Die Probe wurde kurz abzentrifugiert und auf dem Magnet platziert. Nach einer Minute konnte der Überstand entfernt werden.

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Beads in dem Anfangsvolumen (30 μL) resuspendiert und in ein frisches 1,5mL-Tube aliquotiert.

Der ChIP Reaktionsmix wurde angesetzt aus 6 μL 5% BSA, 1,8 μL 200x *protease inhibitor cocktail*, 20 μL 5X *iC1b Buffer*, 1 μL Antikörper (*α -FLAG* oder *Mouse IgG*) und mit *ChIP-seq grade water* auf 70 μL aufgefüllt. Je 70 μL ChIP Reaktionsmix pro Ansatz wurde mit 30 μL gewaschenen *Protein A-coated magnetic beads* gemischt und für 3 h bei 4 °C mit über-Kopf-Rotation inkubiert.

Das fragmentierte Chromatin wurde auf Eis aufgetaut.

Die inkubierten Beads wurden kurz abzentrifugiert. Anschließend wurde je 250 μL fragmentiertes Chromatin dazugegeben. Pro Behandlung wurden 2,5 μL fragmentiertes Chromatin in ein separates 1,5mL-Tube überführt und als Input-Kontrolle bei 4 °C zwischengelagert. Das Chromatin wurde mit den Beads über Nacht bei 4 °C und über-Kopf-Rotation inkubiert.

Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben auf dem Magneten platziert und der Überstand verworfen. Die Chromatin-gekoppelten Beads wurden in je 350 μL *Wash Buffer iW1* resuspendiert und für 5 min bei 4 °C mit über-Kopf-Rotation inkubiert. Dieser Schritt wurde für *iW2-iW4* wiederholt.

3.21.4 DNA-Isolierung und lösen der DNA-Protein-Quervernetzung

Um den *DIB Buffer* zu komplementieren, wurde 1 μL 200X Proteinase K zu 100 μL *DIB Buffer* gegeben.

Nach dem letzten Waschschrift (*iW4*) wurden die Proben kurz zentrifugiert und auf dem Magneten platziert. Der Überstand wurde verworfen und das Bead-Pellet in je 100 μL komplementiertem *DIB Buffer* resuspendiert. Auch die Input-Kontrolle (2,5 μL) wurde mit 97,5 μL *DIB Buffer* versetzt und parallel zu den Proben mitbearbeitet. Alle Proben wurden bei 55 °C für 15 min inkubiert. Gefolgt von 99 °C für 15 min. Anschließend wurden die Proben kurz abzentrifugiert

und auf dem Magnet platziert. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5mL-Tube überführt, er enthält die DNA.

Die isolierte DNA wurde mittels qPCR analysiert und der Rest bei - 20 C° gelagert.

3.21.5 Auswertung der Chromatin-Immunpräzipitation

Die quantitative Analyse des Chromatins erfolgte mittels qPCR und dem *Takyon™ Low ROX SYBR 2X MasterMix blue dTTP*.

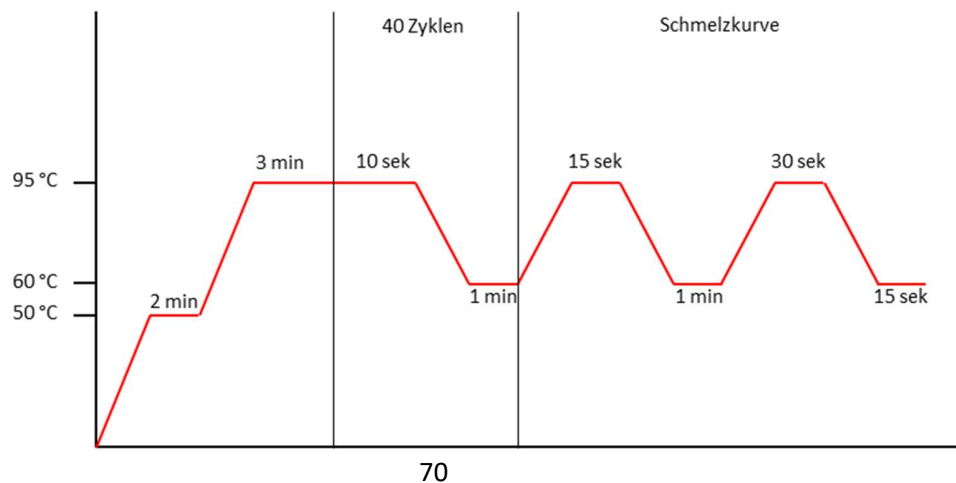
Die verwendeten Primerpaare wurden 1:10 auf 10 µM verdünnt. Das benötigte Verhältnis (50-300 nM) von vorwärts zu rückwärts Primer wurde mittels qPCR unter Verwendung von Standards (600-600.000 Partikel/µL) aus linearisierter Plasmid-DNA in einer vorhergehenden qPCR optimiert.

Für die Input-Kontrolle wurde eine Verdünnungsreihe mit *nuclease-free water* im Verhältnis 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 und 1:128 angesetzt.

Der Master Mix setzte sich aus dem 1X MasterMix und dem jeweiligen Primerpaar (50-300 nM) zusammen, aufgefüllt mit Nuclease-freiem Wasser auf 10 µL.

Je 10 µL Master Mix wurden pro Well einer 96-well Platte in die Platte vorgelegt und mit 5 µL Chromatin, verdünnter Input-Kontrolle oder Nuclease-freiem Wasser als Negativkontrolle, in Triplikaten, versetzt. Durch auf- und ab-pipettieren wurden die Proben gemischt und kurz abzentrifugiert.

Die Messung wurde mit dem *TaqMan 7500 Real-Time PCR System* durchgeführt. Das Amplifikationsprotokoll ist in folgender Grafik schematisch dargestellt:



Zur Kontrolle wurde eine Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurde ein 4%-iges Phor-Agarose-Gel in 1X TAE angesetzt und für mindestens 30 min bei 4 °C vorgekühlt. Das Gel wurde mit je 10 µL PCR-Probe versetzt mit 6x *purple loading dye* (Final: 1X) beladen. Die Elektrophorese lief bei 125 V für etwa 40 min.

Für die quantitative PCR-Analyse wurde die relative Menge an immunpräzipitierter DNA im Vergleich zur Input-DNA der Kontrollregion SMPDL3A berechnet und in %-recovery angegeben.

Die Formel

$$\% \text{ recovery} = 2^{((Ct_{\text{Input}} - 6,64) - Ct_{\text{Probe}})} * 100 \%$$

setzt sich aus den Grenzwert-Zyklen der exponentiellen Phase der qPCR der immunpräzipitierten DNA-Proben (Ct_{Probe}) und der Input-Probe (Ct_{Input}), der Amplifikationseffizienz von 2 und dem Kompensationsfaktor 6,64, um die Input-Verdünnung zu korrigieren, zusammen. Der Kompensationsfaktor ergibt sich aus der Input-Verdünnung, da nur 2,5 µL Input gegen 250 µL Chromatin pro IP verwendet wurde (1%).

3.22 Quantifizierung der Metabolite des CDP-Ethanolamin Syntheseweges mittels LC-ESI-MS/MS

Für die Analyse der Kennedy-Pathway Metabolite (Ethanolamin, Phosphoethanolamin, CDP-Ethanolamin und Phosphatidylethanolamin (PE)), wurden HepG2 Zellen, H-P Zellen und primäre Hepatozyten mit 25 µM Ethanolamin-haltigem MEM und 10 µM Rifampicin über 24 h, 48 h und 72 h behandelt. Für die Ernte wurden die Zellen mit 1X PBS gewaschen und in 1X PBS mit einem *cell-scraper* abgekratzt und in ein 15mL-Tube überführt (es wurden immer 2 Wells gepoolt). Die Zellsuspension wurde für 5 min mit 235 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 mL 1X PBS resuspendiert und in ein 1,5mL-Tube überführt. Ein 100 µL-Aliquot wurde entnommen für die DNA-Quantifizierung. Die Proben wurden für 5 min mit 235 x g bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets in Flüssigstickstoff für 5 min eingefroren. Zwischenlagerung bei -80 °C.

Die Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut, in 150 μL eiskaltem Methanol:Acetonitril:Wasser Puffer (2:2:1) resuspendiert und stark gevortext. Die Proben wurden für 1 min in Flüssigstickstoff eingefroren und bei RT wieder aufgetaut, gefolgt von 10 Zyklen Ultraschallbehandlung im Bioruptor[®] UCD200. Das Wasserbad wurde nach 4-5 Zyklen (je 30 sek ON, 30 sek OFF) gewechselt um die Temperatur unter 8 °C zu halten. Dieser Schritt wurde noch 2-mal wiederholt. Zur Proteinpräzipitation wurden die Proben anschließend über Nacht bei -20 °C inkubiert. Als nächstes wurden die Proben für 15 min mit 16.000 x g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein frisches 1mL-Tube überführt.

3.22.1 Quantifizierung von Phosphoethanolamin

80 μL des Überstands wurde für die Bestimmung von Phosphoethanolamin entnommen. Für die Verdünnungsreihe der Standards wurden Ethanolamin (final: 50 nmol/mL), Phosphoethanolamin (final: 50 nmol/mL) und CDP-Ethanolamin (final: 50 nmol/mL) zu einem Master Mix zusammenpipettiert und mit Methanol:Acetonitril:Wasser (2:2:1) verdünnt. Kalibrierproben im Konzentrationsbereich von 50 pmol/mL bis 50 nmol/mL wurden direkt durch Verdünnung der Stammlösung in Methanol:Acetonitril:Wasser 2:2:1 v/v hergestellt. Jeweils 10 μL interner Standardlösung (10 nmol/mL deuteriertem (d_4) Phosphoethanolamin in Methanol:Acetonitril:Wasser 2:2:1 v/v) wurden zu 10 μL Kalibrierprobe oder 10 μL Probe pipettiert. Nach gründlichem vortexen und abzentrifugieren, wurden die Proben im Stickstoffstrom bei 40 °C eingengt. Das Präzipitat wurde in 50 μL mobile Phase B (mobile Phase A: 20 mM Ammoniumformiat pH2,5; mobile Phase B: Acetonitril: mobile Phase A 1:9 v/v) aufgenommen und gründlich gevortext und für 10 min mit 21.130 x g bei 4 °C zentrifugiert. Je 45 μL der Probe wurden in eine 96-Well Platte pipettiert und mit einer Matte verschlossen. Die Quantifizierung von Phosphoethanolamin erfolgte mit dem Triple Quadrupol LC-MS-MS-System mit JetStream Electrospray-Quelle und Ion Funnel (LC-ESI-MS/MS) im negative Ionenmodus. Die chromatographische Trennung wurde mit einer ZORBAY HILIC Plus-Säule (2.1 x 50 mm, 3.5 μm Partikelgröße, Agilent) bei 40 °C und einem Fluss von 0.6 mL/min durchgeführt. Der verwendete Gradient ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: HPLC-Gradient für die Bestimmung von Phosphoethanolamin

Zeit	A	B
1.00 min	0.00 %	100.00 %
6.00 min	47.50 %	52.50 %
7.00 min	70.00 %	30.00 %
10.00 min	70.00 %	30.00 %
12.00 min	0.00 %	100.00 %
16.00 min	0.00 %	100.00 %

Die Messung erfolgte im Multiple Reaction Monitoring (MRM) Modus, als Precursor-Ion wurde das jeweilige $[M-H]^-$ Ion verwendet, die substanzspezifischen Parameter sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: MRM-Übergänge und MS-Parameter für die Bestimmung von Phosphoethanolamin

Analyt	MRM-Übergang (m/z)	Dwell time (ms)	Collision energy (V)	Cell Accelerator (V)
Phosphoethanolamin	140 > 79	50	28	7
d ₄ -Phosphoethanolamin	144 > 79	100	20	7

Die Quellenparameter waren: Gas Temperatur 225 °C, Gas Flow 11 L/min (N₂), Nebulizer 20 psi, Sheath Gas Heater 350 °C, Sheath Gas Flow 11 L/min (N₂), Capillary Voltage 3.500 V und Nozzle voltage 1.000 V. Die Fragmentorspannung betrug 380 V.

Die anhand interner Standard-Kalibration erstellten Kalibrierkurven wurden durch gewichtete ($1/x$, x = Gehalt Analyt/Gehalt interner Standard) lineare Regression für das Peakflächenverhältnis des Analyten durch den internen Standard gegen das Konzentrationsverhältnis Analyt durch

internen Standard erhalten. Die Konzentration in der Probe wurde anhand der Regression ermittelt. Die quantitative Auswertung erfolgte mit der MassHunter Quantitative Analysis Software.

3.22.2 Bestimmung der Phosphatidylethanolamine

50 μL des Überstands wurde für die Bestimmung der Phosphatidylethanolamine (PEs) entnommen und mit 10 μL interner Standardlösung (54 pmol/mL Lyso-PE 17:0 und 69.5 pmol/mL PE 34:0 in 2-Propanol:Methanol 3:1 v/v) versetzt, gemischt, im Stickstoffstrom eingengt und der Rückstand in 50 μL 2-Propanol:Methanol 3:1 aufgenommen.

Die PEs wurde auf einer BEH C8-Säule (2.1 x 100 mm, 1.7 μM Partikelgröße) bei 60 °C und einem Fluss von 0.45 mL/min getrennt. Als Gradientenfließmittel wurden 5 mM Ammoniumacetat in Wasser/Methanol 80:20 v/v als mobile Phase A und 5 mM Ammoniumacetat in Methanol/Acetonitril/2-Propanol 75:20:5 v/v als mobile Phase B eingesetzt, der Gradient ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: HPLC-Gradient für die Bestimmung der Phosphatidylethanolamine

Zeit	A	B
1.00 min	35.00 %	65.00 %
4.00 min	20.00 %	80.00 %
20.00 min	0.00 %	100.00 %
25.00 min	0.00 %	100.00 %
26.50 min	35.00 %	65.00 %
30.00 min	35.00 %	65.00 %

Die MS-Bestimmung erfolgte im positiven Ionenmodus durch Neutral Loss Scan von 141 Da im Scanbereich von 350 bis 100 m/z und einer Collision Energy von 18 V. PE mit d4-Ethanolamin-Kopfgruppe wurde entsprechend durch Neutral Loss Scan von 145 Da bestimmt.

Die Quellenparameter waren: Gas Temperatur 225 °C, Gas Flow 11 L/min (N₂), Nebulizer 20 psi, Sheath Gas Heater 350 °C, Sheath Gas Flow 11 L/min (N₂), Capillary Voltage 3500 V und Nozzle Voltage 1000 V. Die Fragmentorspannung betrug 380 V.

Die Peakflächen der einzelnen PE-Spezies wurden auf die Fläche des internen Standards (Lyso-PE 17:1 für alle Lyso-PEs und PE 34:0 für alle di-Acyl-PEs) normiert (Peakfläche*100/Peakfläche des Internen Standards). In Tabelle 4 sind die dazugehörigen Massen und die Summenformel aufgelistet.

Tabelle 4: Auflistung der Massen und Summenformeln des als Internen Standard verwendeten LPE 17:1 und PE 34:0.

		Masse [g/mol]	Summenformel
Interner Standard	LPE 17:1	465,29	C ₂₂ H ₄₄ NO ₇ P
	PE 34:0	719,55	C ₃₉ H ₇₈ NO ₈ P

Die gefundenen PE-Spezies sind in Tabelle 5 aufgelistet und die gefundenen LPE-Spezies sind in Tabelle 6 zu finden.

Tabelle 5: Auflistung aller gemessenen PE-Spezies mit den dazugehörigen Massen und Summenformeln.

	Masse [g/mol]	Summenformel		Masse [g/mol]	Summenformel
d4-PE 32:1	693,52	C ₃₇ H ₆₈ D ₄ NO ₇ P	PE 32:1	689,50	C ₃₇ H ₇₂ NO ₈ P
d4-PE 32:2	691,51	C ₃₇ H ₆₆ D ₄ NO ₇ P	PE 32:2	687,48	C ₃₇ H ₇₀ NO ₈ P
d4-PE 34:1	721,56	C ₃₉ H ₇₂ D ₄ NO ₇ P	PE 34:1	717,53	C ₃₉ H ₇₆ NO ₈ P
d4-PE 34:2	719,54	C ₃₉ H ₇₀ D ₄ NO ₇ P	PE 34:2	715,52	C ₃₉ H ₇₄ NO ₈ P
d4-PE 34:4	715,51	C ₃₉ H ₆₆ D ₄ NO ₇ P	PE 34:4	711,48	C ₃₉ H ₇₀ NO ₈ P
d4-PE 36:1	749,59	C ₄₁ H ₇₆ D ₄ NO ₇ P	PE 36:1	745,56	C ₄₁ H ₈₀ NO ₈ P
d4-PE 36:2	747,57	C ₄₁ H ₇₄ D ₄ NO ₇ P	PE 36:2	743,55	C ₄₁ H ₇₈ NO ₈ P
d4-PE 36:3	745,56	C ₄₁ H ₇₂ D ₄ NO ₇ P	PE 36:3	741,53	C ₄₁ H ₇₆ NO ₈ P
d4-PE 36:4	743,54	C ₄₁ H ₇₀ D ₄ NO ₇ P	PE 36:4	739,52	C ₄₁ H ₇₄ NO ₈ P
d4-PE 36:5	741,52	C ₄₁ H ₆₈ D ₄ NO ₇ P	PE 36:5	737,50	C ₄₁ H ₇₂ NO ₈ P
d4-PE 36:6	739,51	C ₄₁ H ₆₆ D ₄ NO ₇ P	PE 36:6	735,48	C ₄₁ H ₇₀ NO ₈ P
d4-PE 38:2	775,60	C ₄₃ H ₇₈ D ₄ NO ₇ P	PE 38:2	771,58	C ₄₃ H ₈₂ NO ₈ P
d4-PE 38:3	773,59	C ₄₃ H ₇₆ D ₄ NO ₇ P	PE 38:3	769,56	C ₄₃ H ₈₀ NO ₈ P
d4-PE 38:4	771,57	C ₄₃ H ₇₄ D ₄ NO ₇ P	PE 38:4	767,55	C ₄₃ H ₇₈ NO ₈ P
d4-PE 38:5	769,56	C ₄₃ H ₇₂ D ₄ NO ₇ P	PE 38:5	765,53	C ₄₃ H ₇₆ NO ₈ P
d4-PE 38:6	767,54	C ₄₃ H ₇₀ D ₄ NO ₇ P	PE 38:6	763,52	C ₄₃ H ₇₄ NO ₈ P
d4-PE 38:7	765,52	C ₄₃ H ₆₈ D ₄ NO ₇ P	PE 38:7	761,50	C ₄₃ H ₇₂ NO ₈ P
d4-PE 40:4	799,60	C ₄₅ H ₇₈ D ₄ NO ₇ P	PE 40:4	795,58	C ₄₅ H ₈₂ NO ₈ P
d4-PE 40:5	797,59	C ₄₅ H ₇₆ D ₄ NO ₇ P	PE 40:5	793,56	C ₄₅ H ₈₀ NO ₈ P
d4-PE 40:6	795,57	C ₄₅ H ₇₄ D ₄ NO ₇ P	PE 40:6	791,55	C ₄₅ H ₇₈ NO ₈ P
d4-PE 40:7	793,56	C ₄₅ H ₇₂ D ₄ NO ₇ P	PE 40:7	789,53	C ₄₅ H ₇₆ NO ₈ P
d4-PE 40:8	791,54	C ₄₅ H ₇₀ D ₄ NO ₇ P	PE 40:8	787,52	C ₄₅ H ₇₄ NO ₈ P

Tabelle 6: Auflistung der gefundenen LPE-Spezies mit den dazugehörigen Massen und Summenformeln

	Masse [g/mol]	Summenformel			Masse [g/mol]	Summenformel
d4-LPE 16:0	457,31	C ₂₁ H ₄₀ D ₄ NO ₇ P		LPE 16:0	453,29	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P
d4-LPE 18:0	485,34	C ₂₃ H ₄₄ D ₄ NO ₇ P		LPE 18:0	481,32	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P
d4-LPE 18:1	483,33	C ₂₃ H ₄₂ D ₄ NO ₇ P		LPE 18:1	479,30	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P
d4-LPE 20:4	505,31	C ₂₅ H ₄₀ D ₄ NO ₇ P		LPE 20:4	501,29	C ₂₅ H ₄₄ NO ₇ P
d4-LPE 22:6	529,31	C ₂₇ H ₄₀ D ₄ NO ₇ P		LPE 22:6	525,29	C ₂₇ H ₄₄ NO ₇ P

3.22.3 DNA-Quantifizierung

Zu Beginn wurde der *10X Fluorescent assay buffer* 1:10 mit ddH₂O verdünnt. Außerdem wurde die 2 mg/mL BisBenzimid-Stocklösung und der 1 mg/mL *Calf Thymus DNA standard D4810* bei RT aufgetaut. 33 µL des 1 mg/mL *Calf Thymus DNA standard D4810* wurden bei 50 °C für 15 min erhitzt und mit 1X Assay Puffer auf die Endkonzentration von 100 ng/µL verdünnt. Aus diesem Stock wurde die Standardreihe (32, 16, 12, 8, 4, 2, 1,5, 1, 0,5, 0,25, 0,125 nM) angesetzt. Die 2 mg/mL BisBenzimid-Stocklösung wurde 1:1000 mit 1X Assay Puffer verdünnt um die Endkonzentration von 2 µg/mL zu erreichen.

Die zu quantifizierenden Proben wurden auf Eis aufgetaut und mit je 200 µL 0,1% SDS für die Lyse vermischt. Anschließend wurden die Proben je 2 Zyklen (je 30 sek ON, 30 sek OFF) im Bioruptor® UCD200 sonifiziert. Nach der Zentrifugation bei 16.000 x g für 5 min bei RT, wurden die Proben mit 1X Assay Puffer 1:5 verdünnt. Pro Well wurden 45 µL 1X Assay Puffer vorgelegt und je 5 µL Probe oder Standard dazupipettiert. Als Backgroundkontrolle wurden 50 µL 1X Assay Puffer verwendet.

Je 200 μL der 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BisBenzimid-Lösung wurden mit der Multipette pro Well ddazupipettiert und bei RT für 15 min bei 350 rpm im Dunkeln inkubiert

Die Messung erfolgt am *EnSpire® multimode plate reader* bei der Wellenlänge 360/460 nm.

Die DNA-Konzentration in der Probe wurde mittels der Standardkurve berechnet und zur Normalisierung der gemessenen Metabolit-Proben eingesetzt.

3.23 Statistische Analyse

Ergebnisse aus Experimenten mit mindestens drei unabhängigen Experimenten wurden statistisch mit der GraphPad Prism Software 8.3 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) ausgewertet. Für die Daten aus PHH wurde der *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* oder der *Friedman Test* mit anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* durchgeführt. Dargestellt wurde der Median mit Interquartilabständen. Die Daten aus Zelllinien wurden als normalverteilt betrachtet und mittels *1-way ANOVA* und *Dunnett's multiple comparisons test* ausgewertet. Die Darstellung erfolgte als Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall.

4 Ergebnisse

4.1 Induktion der ETNPPL Expression durch PXR Aktivierung auf RNA Ebene

Eine Genom-weite Genexpressionsanalyse mit 6 individuellen Hepatozyten-Spendern und einer 24-stündigen Behandlung mit 10 μM Rifampicin ergab 498 Gene, die durch Rifampicin-Behandlung hoch- oder herunterreguliert werden (Kandel et al., 2016). Eines dieser Gene war ETNPPL (AGXT2L1), das in Beziehung zum Phospholipidstoffwechsel steht, und auf Grund der Hochregulierung durch Rifampicin-Behandlung vermutlich direkt durch PXR reguliert wird.

Mittels Kombination aus siRNA-vermitteltem Knockdown und quantitativer Echtzeit-PCR, wurde die PXR-Abhängigkeit der Induktion der Genexpression von ETNPPL durch Rifampicin nachgewiesen. Abbildung 7 zeigt die Genexpression von ETNPPL nach Messung der RNA-Proben von 9 verschiedenen primären humanen Hepatozyten nach PXR Aktivierung (RIF) oder Knockdown (siPXR).

Die Genexpression von ETNPPL ist nach Rifampicin-Behandlung um das 6-fache erhöht. Keine Induktion erfolgt dagegen, wenn PXR durch siRNA-vermitteltem Knockdown herunterreguliert wird.

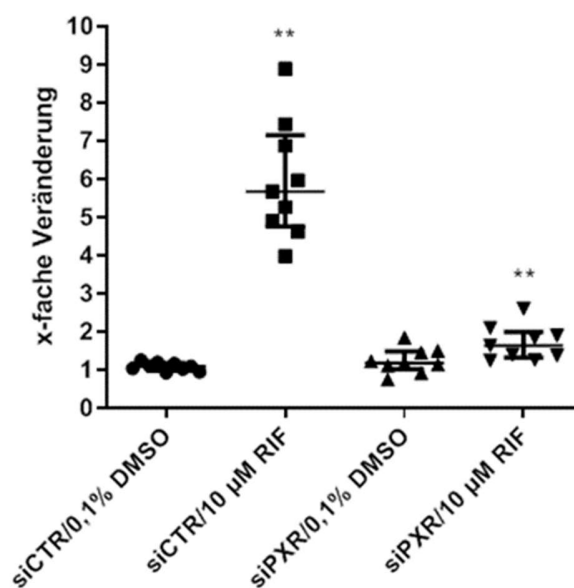


Abbildung 7: Die Induktion der Genexpression von ETNPPL durch Rifampicin ist PXR-abhängig.

*Die Genexpression wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR-Messung von 9 individuellen primären humanen Hepatozyten RNAs, behandelt mit 10 µM Rifampicin oder 0,1% DMSO in Kontrollzellen (siCTR) oder PXR-Knockdown Zellen (siPXR), nach 24 h ermittelt. Der Median mit Interquartilabständen für die einzelnen Messwerte ist dargestellt. Die Auswirkungen der Rifampicin-Behandlung im Vergleich zur entsprechenden DMSO Behandlung wurde mittels Wilcoxon matched-pairs signed rank test untersucht (**, $p \leq 0,01$).*

4.2 Induktion der ETNPPL Expression durch PXR Aktivierung auf Protein Ebene

Um die funktionelle Relevanz der Induktion auf RNA-Ebene festzustellen, wurde die Proteinexpression von ETNPPL in 5 verschiedenen primären Hepatozyten Kulturen mittels Western Blot Analyse untersucht.

Abbildung 8A zeigt einen repräsentativen Western Blot. Für die mit Rifampicin behandelten Kulturen ist eine deutliche Bande zu erkennen, während für die mit DMSO behandelten Kulturen nur schwache Banden zu sehen sind.

In Abbildung 8B ist das Mittel der normalisierten relativen Intensität der jeweiligen 3 Messungen der 5 Kulturen nach Rifampicin- oder DMSO-Behandlung dargestellt.

Die Proteinexpression von ETNPPL ist nach Rifampicin-Behandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle um das 3- bis 16-fache erhöht.

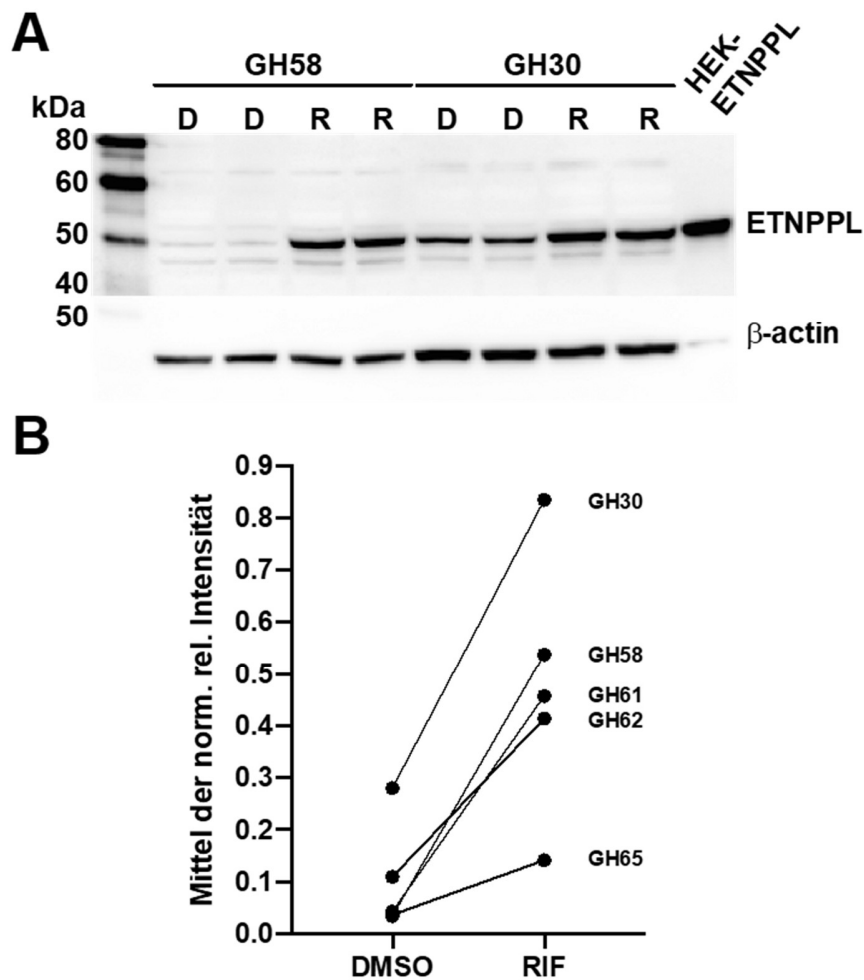


Abbildung 8: Die Proteinkonzentration von ETNPPL ist nach PXR-Aktivierung erhöht.

Durch eine Western Blot Analyse von 5 individuellen primären humanen Hepatozyten Kulturen, mit Matrigel überschichtet und behandelt mit 10 μ M Rifampicin oder 0,1% DMSO über 48 h, wurde die Proteinkonzentration von ETNPPL bestimmt. Als Positivkontrolle wurde das Proteinlysate von mit ETNPPL-Expressionsvektor transfizierten HEK-Zellen aufgetragen. Die β -Aktin Kontrolle zeigt eine vergleichbare Gelbeladung und wurde zur Normalisierung der ETNPPL Proteinexpression innerhalb eines Spenders verwendet, um einen Vergleich von Rifampicin- und DMSO-Behandlung zu ermöglichen. In (A) ist ein repräsentativer Western Blot gezeigt. (B) zeigt den Mittelwert der normalisierten relativen Intensität der jeweiligen 3 Messungen der verwendeten 5 primären Hepatozyten Kulturen nach Rifampicin- oder DMSO-Behandlung in Bezug auf die Positivkontrolle.

4.3 Bindung von PXR an spezifische Motive von ETNPPL oberhalb des Promoters

Durch den direkten Vergleich von PXR-Knockdown und den Kontrollzellen wurde gezeigt, dass ETNPPL PXR-abhängig induziert wird. Da PXR seine Zielgene in der Regel direkt transkriptionell reguliert, sollte in diesem Abschnitt nach möglichen Bindestellen gesucht werden.

4.3.1 Identifizierung der regulatorischen Regionen von ETNPPL mittels Transfektion

Für das ETNPPL Gen wurden mittels *in silico* Genomanalysen mit NubiScan V2.0 (M. Podvinec; University of Basel, 2021) und DNASTAR GeneQuest 5 Regionen oberhalb der Transkriptionsstartstelle mit potenziellen PXR Bindemotiven identifiziert.

Die identifizierten Regionen wurden mittels PCR amplifiziert und in den Leervektor pGL3-Tk(-105) kloniert, der einen Tk-Promoter vor einem Luciferasegen besitzt. Mittels Transfektion in HepG2 Zellen und anschließendem Luciferase-Reporterassay ist die Regulierung der Regionen durch PXR nach Behandlung mit 10 μ M Rifampicin für 24 h untersucht worden.

Die Lage aller identifizierten Regionen von ETNPPL in Bezug auf das erste Exon ist in Abbildung 9A schematisch dargestellt.

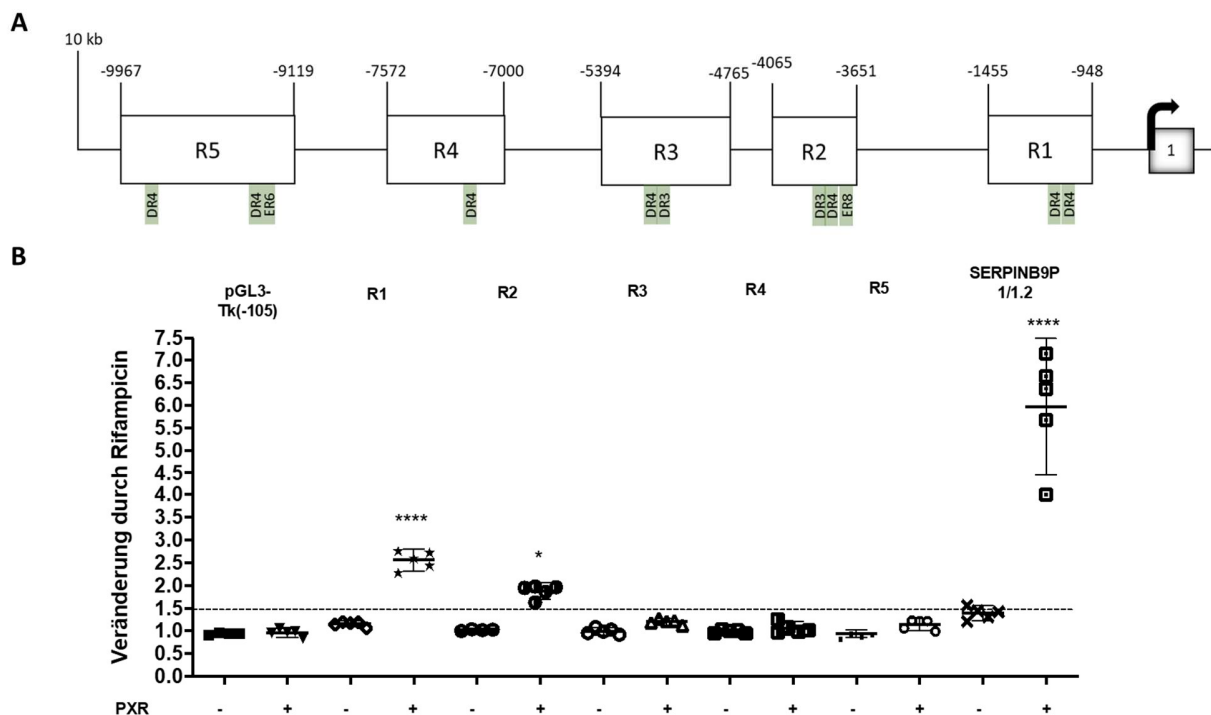


Abbildung 9: Identifizierung von zwei potenziellen Regionen oberhalb des ersten Exons von ETNPPL, die PXR-abhängig reguliert werden.

(A) Schema aller identifizierten Regionen (R1-R5) mit möglichen PXR Bindemotiven oberhalb des ersten Exons von ETNPPL.

(B) Die identifizierten Regionen wurden in den Reporterengenvektor pGL3-Tk(-105) kloniert und jeweils zusammen mit den Expressionsplasmiden von PXR und RXR α (+) bzw. dem leeren Expressionsvektor pcDNA3 und RXR α (-) in HepG2 Zellen kotransfiziert. Mittels Luciferase-Reporterassay wurde die Veränderung durch Rifampicin-Behandlung bestimmt. Das PXR-abhängige Reportergenkonstrukt der Intron Region des SERPINB9P1/1.2 wurde als Positivkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte der 5 unabhängigen Experimente, durchgeführt in Triplikaten, mit 95 % Konfidenzintervall nach Rifampicin-Behandlung. Die Auswirkung der Rifampicin-Behandlung auf die Aktivität des jeweiligen Reportergenplasmids im Vergleich zum Leervektor wurde mittels 1-way ANOVA untersucht und mittels Dunnett's multiple comparisons test korrigiert (****, $p \leq 0,0001$; *, $p \leq 0,05$).

Abbildung 9B zeigt eine PXR-abhängige, signifikante Hochregulierung der R1- und R2-Regionen durch Rifampicin von 2,7-fach (R1) und 1,9-fach (R2) im Vergleich zum Leervektor, was auf zwei potenzielle PXR-abhängige Enhancerregionen hindeutet.

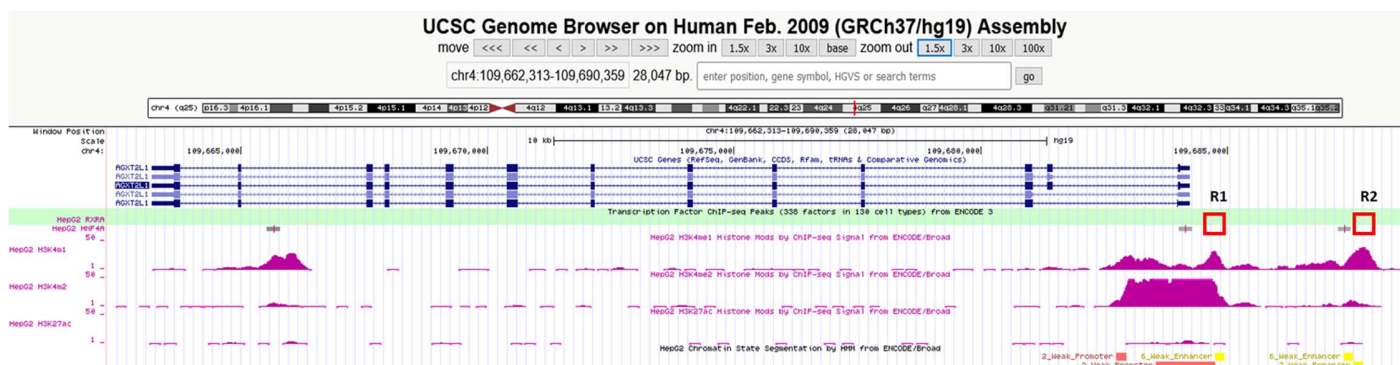


Abbildung 10: Auszug des auf Chromatin 4 liegenden ETNPPL (AGXT2L1) aus dem UCSC Genome Browser. Dargestellt ist die Lage der R1- und R2-Region (rote Kästchen), sowie die HNF4 α -Bindestellen, die Positionen der Histonmodifikationen (H3K4m1, H3K4m2, H3K27ac) und die Aufteilung des Chromatinzustands in HepG2 Zellen (Kent et al., 2002a).

Die R1-Region liegt bei etwa -950 bp oberhalb des ersten Exons, wie in Abbildung 10 zu sehen, und weist zwei DR4-Motive auf (siehe auch Abbildung 9A). Die R2-Region befindet sich etwa bei -3600 bp oberhalb des ersten Exons und weist ein DR3-, ein DR4- und ein ER8-Motiv auf. Einen Hinweis auf transkriptionell aktives Chromatin oberhalb des Promoters geben die in den Bereichen der R1- und R2-Region auftretenden Methylierungen der Lysine des Histon 3 (siehe Abbildung 10). Eine detailliertere Beschreibung der identifizierten Enhancerregionen mit ihren potenziellen PXR-Bindemotiven ist Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Detaillierte Beschreibung der gefundenen PXR-Bindemotiven für die R1- und R2-Region. Dargestellt sind für jede Region die potenziellen PXR-Bindemotive mit ihrer Position im AC097473.3 - ENSE00001302560 und dem jeweiligen RAW-Score aus NubiScan oder der prozentualen Übereinstimmung der Sequenz mit dem Konsensus aus GeneQuest (DNASTAR).

Regionen	PXR-Bindemotive	Position auf AC097473.3	NubiScan-RAW-Score (Threshold = 0,7)	GeneQuest
R1 (27580-28086)	DR4-1	27785-27800	-	94%
	DR4-2	27750-27765	-	94%
R2 (30283-30696)	DR3	30481-30495	-	93%
	DR4	30457-30472	-	94%
	ER8	30351-30370	0,78	-

4.3.2 Identifizierung der PXR-Bindestellen in R1- und R2-Regionen von ETNPPL mittels EMSA

Nach Ermittlung der PXR-abhängig regulierten Regionen R1 und R2 wurden die hier liegenden potenziellen PXR-Bindemotive mittels *Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA) in vitro* auf tatsächliche PXR-Bindung untersucht. Sowohl für die R1-Region als auch für die R2-Region sind Interaktionen von PXR mit den jeweiligen Bindemotiven in unterschiedlicher Intensität zu sehen. Abbildung 11A und Abbildung 12A zeigen die spezifischen Bandenshifts durch PXR/RXR α Heterodimer-Bindung an die jeweiligen Bindemotive der Regionen.

Für die R1-Region zeigt das zweite DR4-Motiv (DR4-2) die stärkere Bande, während für die R2-Region das DR3-Motiv die stärkere Interaktion aufweist. Die Bindemotive der R1-Region zeigen insgesamt eine stärkere Interaktion mit PXR/RXR α , da die Banden deutlich prominenter sind im Vergleich zu dem stärksten Motiv der R2-Region (R2-DR3), wie in Abbildung 11A zu sehen ist.

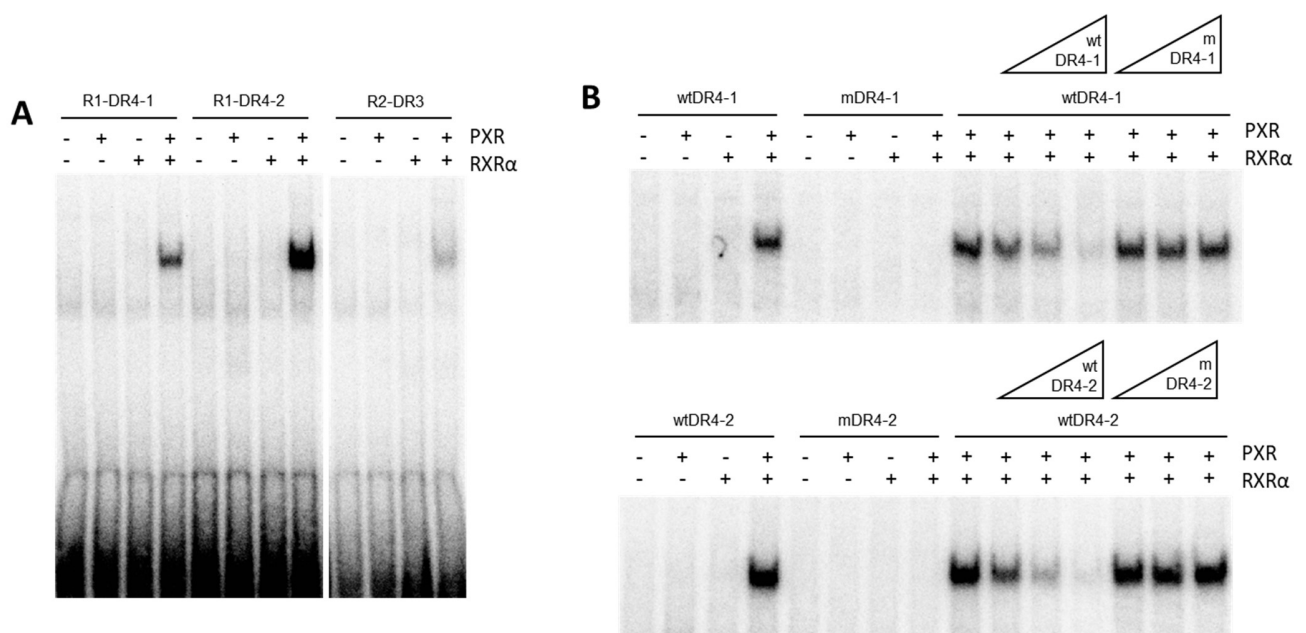


Abbildung 11: Untersuchung der PXR-Bindestellen der R1-Region von ETNPPL mittels EMSA.

(A) Dargestellt ist ein exemplarischer EMSA. Verwendet wurde *in vitro* translatiertes PXR und/oder RXR α , sowie die Oligonukleotide, welche die radioaktiv markierten DR4-Motive enthalten. Eine Bindung an das entsprechende Motiv ist nur mit PXR/RXR α -Heterodimer zu sehen ($n = 3$). Zum Vergleichen wurde das DR3-Motiv der R2-Region aus Abbildung 12 herangezogen.

(B) Gezeigt sind repräsentative Gele eines EMSA mit Oligonukleotiden, die das radioaktiv markierte wildtypische (wt) oder mutierte (m) Motiv enthalten, sowie die Kompetitionsanalyse mit steigendem molarem Überschuss (5x, 25x, 125x) der jeweiligen wildtypischen Oligonukleotide (wt) im Vergleich zum mutierten (m) Motiv. Oben für das DR4-1 Motiv (n = 3), unten für das DR4-2 Motiv (n = 3).

Um die Spezifität der PXR Bindung zu überprüfen, wurden die Bindemotive der jeweiligen Region einzeln mutiert (m) und in einem EMSA gegen das jeweilige wildtypische (wt) Motiv verglichen. Wie in Abbildung 11B und Abbildung 12B zu sehen, ist keine Interaktion von PXR/RXRα mit den Bindemotiv-enthaltenden Oligonukleotiden der R1- und R2-Region nach erfolgter Mutation zu erkennen.

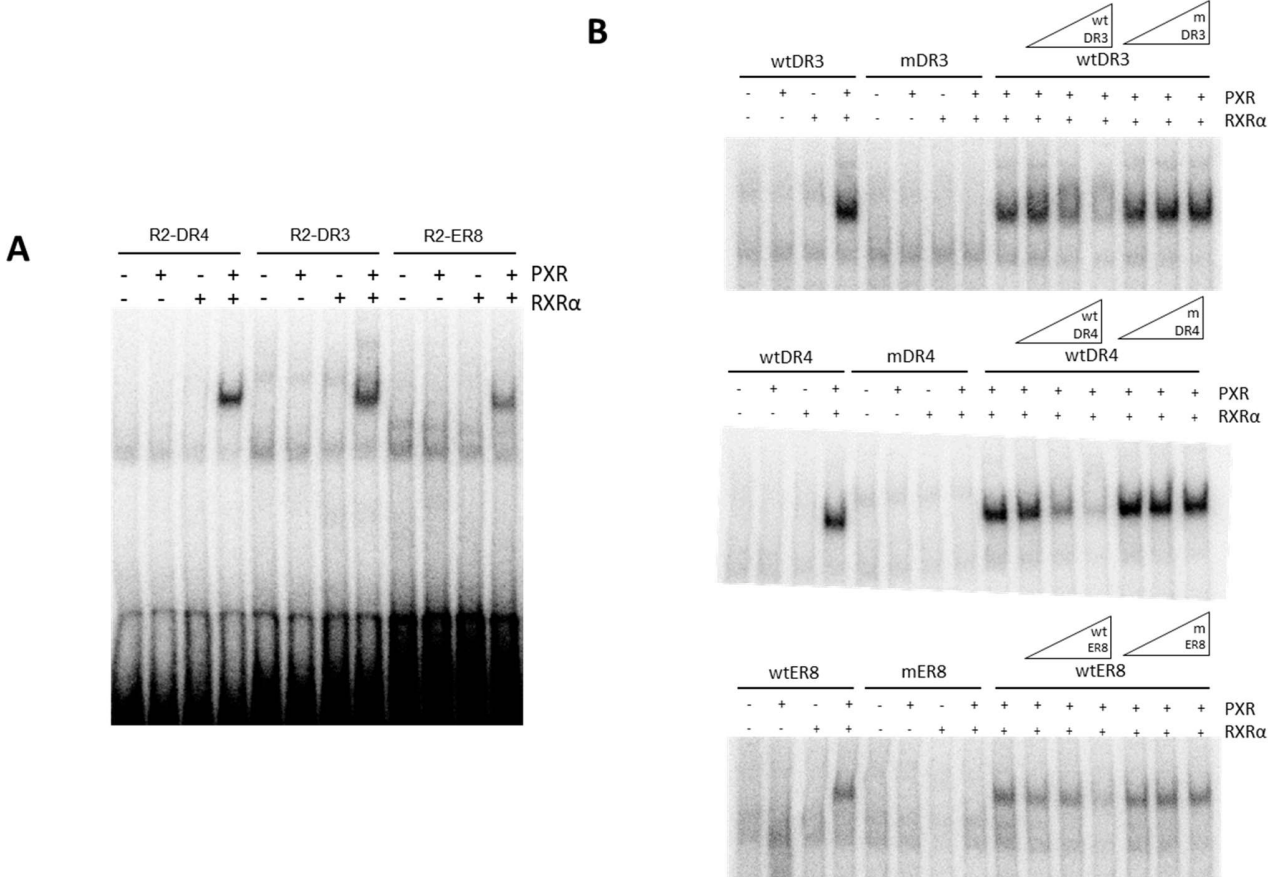


Abbildung 12: Untersuchung der PXR-Bindestellen der R2-Region von ETNPPL mittels EMSA.

(A) Dargestellt ist ein exemplarischer EMSA. Verwendet wurde *in vitro* translatiertes PXR und/oder RXRα, sowie die Oligonukleotide, welche das radioaktiv markierte DR4-, DR3- oder ER8-Motiv enthalten. Eine Bindung an das entsprechende Motiv ist nur mit PXR/RXRα-Heterodimer zu sehen (n = 3).

(B) Gezeigt sind repräsentative Gele eines EMSA mit Oligonukleotiden, die das radioaktiv markierte wildtypische (wt) oder mutierte (m) Motiv enthalten, sowie die Kompetitionsanalyse mit steigendem molarem Überschuss (5x, 25x, 125x) der jeweiligen wildtypischen Oligonukleotide (wt) im Vergleich zum mutierten (m) Motiv. Oben für das DR3 Motiv ($n = 2$), in der Mitte für das DR4 Motiv ($n = 2$) und unten für das ER8 Motiv ($n = 2$).

Ebenfalls wurde eine Kompetitionsanalyse durchgeführt, um die Spezifität der einzelnen Elemente zu überprüfen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11B und Abbildung 12B zu sehen.

Dazu wurden die einzelnen Bindemotive mit ansteigendem molarem Überschuss (5x, 25x, 125x) von nicht-markierten wildtypischen (wt) oder mutiertem (m) Oligonukleotiden versetzt, wodurch es zu einer Konkurrenz um die PXR/RXR α Bindung kommt. Mit steigender Konzentration der nicht-markierten wildtypischen Oligonukleotide ist eine Abnahme der Interaktion des PXR/RXR α Heterodimers mit der Bindestelle sowohl für die R1- als auch für die R2-Region zu erkennen. Dies ist bei den nicht-markierten mutierten Oligonukleotiden nicht zu beobachten.

PXR bindet spezifisch an alle gefundenen Bindemotive der R1- (DR4-1 und DR4-2) und R2-Region (DR4, DR3 und ER8), wobei das DR4-2 Motiv der R1-Region und das DR3-Motiv der R2-Region jeweils am stärksten mit PXR/RXR α interagiert.

4.3.3 Untersuchung der identifizierten regulatorischen Regionen von ETNPPL mittels Chromatin Immunpräzipitation

Die Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) wurde durchgeführt, um die DNA-Protein-Interaktion, die mittels EMSA gezeigt wurde, *in vivo* zu validieren und somit die direkte Regulation von ETNPPL durch PXR zu bestätigen.

Dazu wurde die Bindung von PXR an die R1-Region des ETNPPL-Gens mittels ChIP in HepG2 Zellen untersucht. In einer vorhergehenden Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die ChIP nach Transfektion des PXR-Expressionsplasmids und IP mit den verfügbaren PXR-Antikörpern nicht funktioniert hat (Jeske et al., 2017). Daher wurden die HepG2 Zellen hier direkt mit einem Expressionsplasmid, welches für ein PXR-Protein mit FLAG-tag kodiert, transfiziert und die IP,

nach Behandlung mit 10 μ M Rifampicin oder 0,1% DMSO für 3 h, mit einem FLAG-Antikörper durchgeführt.

Die Bindung von PXR an die entsprechende Region im Intron 1 des SMPDL3A wurde als Positivkontrolle verwendet (Jeske et al., 2017). Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten mit den in Triplikaten aufgetragenen PCR-Produkten der R1-Region des ETNPPL-Gens und von SMPDL3A. Eine Bindung von PXR an die R1-Region kann durch Verwendung des Anti-FLAG-Antikörpers nachgewiesen werden. Die Bindung von PXR an die Region im Intron 1 des SMPDL3A diente als Positivkontrolle.

Die Spezifität des Anti-FLAG-Antikörpers wird durch die fehlenden beziehungsweise schwächeren Banden der Immunpräzipitation mit dem unspezifischen Maus IgG (Diagenode) gezeigt. Da zwischen den Behandlungen mit DMSO oder Rifampicin kein Unterschied zu erkennen ist, verändert die Aktivierung von PXR durch Rifampicin die Bindungsaffinität von PXR an die untersuchte R1-Region im ETNPPL Chromatin nicht.

Eine quantitative Auswertung war auf Grund der hohen Schwankungen der gemessenen Ct-Werte nicht möglich. Dennoch konnte die direkte Bindung von PXR an die R1-Region des ETNPPL auch *in vivo* über die auf Gele aufgetragenen PCR-Produkte gezeigt werden.

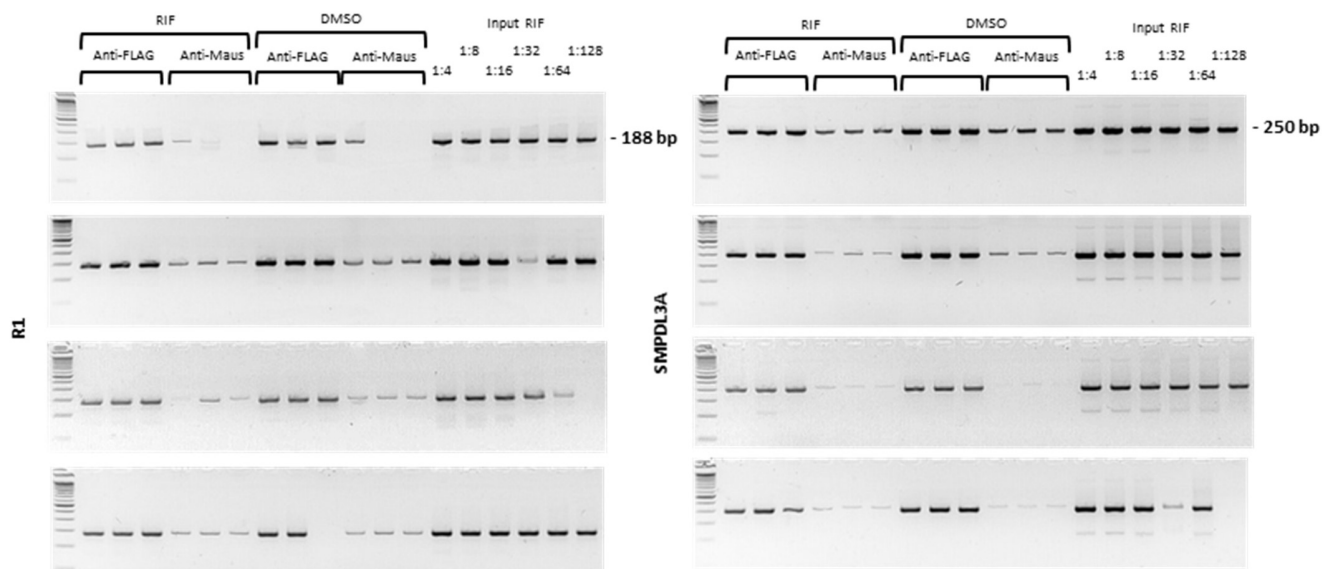


Abbildung 13: PXR bindet an die regulatorische Region R1 von ETNPPL.

Abgebildet sind die auf Gele aufgetragenen PCR-Produkten, in dreifach Messung, für die R1-Region des ETNPPL (links) und SMPDL3A (Positivkontrolle, rechts).

Die dargestellten Gele sind das Ergebnis von 4 unabhängigen Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP). Die jeweiligen Banden zeigen die Akkumulation spezifischer PCR-Produkte, die abhängig von der Behandlung der Proben mit Rifampicin (RIF) oder DMSO und dem jeweiligen Antikörper (Anti-FLAG/Anti-Maus) bzw. der nicht mit Antikörper behandelten Inputkontrolle (Input) im Gel gebildet werden.

4.3.4 Untersuchung der identifizierten regulatorischen Regionen von ETNPPL mittels Transfektion

Nach Identifikation einer möglichen TATA-Box (-24 bp oberhalb des ersten Exons) wurden zwei verschiedene ETNPPL-Promotor-Konstrukte generiert, von denen das eine 382 bp (-378 bis +4) und das andere 431 bp (-378 bis +53) lang war, jeweils ausgehend vom Beginn des ersten Exons. Die Aktivität des längeren Konstrukts war deutlich höher (etwa 3-fach) im Vergleich zum kürzeren Konstrukt (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde das längere Promotor-Konstrukt zur weiteren Untersuchung der identifizierten Enhancerregionen von ETNPPL, R1 und R2, verwendet. Dazu wurde die gesamte Region von -1455 bis +53 einschließlich der R1-Region und des Promotors (R1-Konstrukt) mittels PCR in den Reportervektor pGL4.10(luc2) kloniert, der keinen eigenen Promoter aufweist. Analog entstanden das R1-R2-Konstrukt, ausgehend vom R1-R2-Konstrukt das R2-Konstrukt und als Kontrolle das Konstrukt ohne Enhancerregionen (Promotor). Diese vier Konstrukte wurden in HepG2 Zellen transfiziert und für 24 h mit 10 µM Rifampicin behandelt. Abbildung 14A zeigt, dass der ETNPPL eigene Promotor (Promotor) dieselbe Aktivität aufweist wie der Leervektor pGL4.10(luc2) nach Rifampicin-Behandlung. Die R1-Region zeigt eine 3,3-fache Hochregulierung der Aktivität im Vergleich zum ETNPPL eigenen Promotor, während die R2-Region einen 1,9-fachen Anstieg der Aktivität erkennen lässt. Das Konstrukt mit beiden Enhancerregionen (R1-R2) weist einen additiven Effekt von etwa 4,7-facher Aktivität auf. Die Auswirkung der Mutation der einzelnen Bindemotive wurde untersucht, um herauszufinden, welches der Bindemotive an der Aktivierung durch PXR beteiligt ist. Dazu wurde jedes Bindemotiv der R1-Region einzeln und gemeinsam mutiert. Für die R2-Region wurde nur das DR4-Motiv einzeln und in Kombination mit dem DR3-Motiv mutiert. Das ER8-Motiv wurde nicht mutiert.

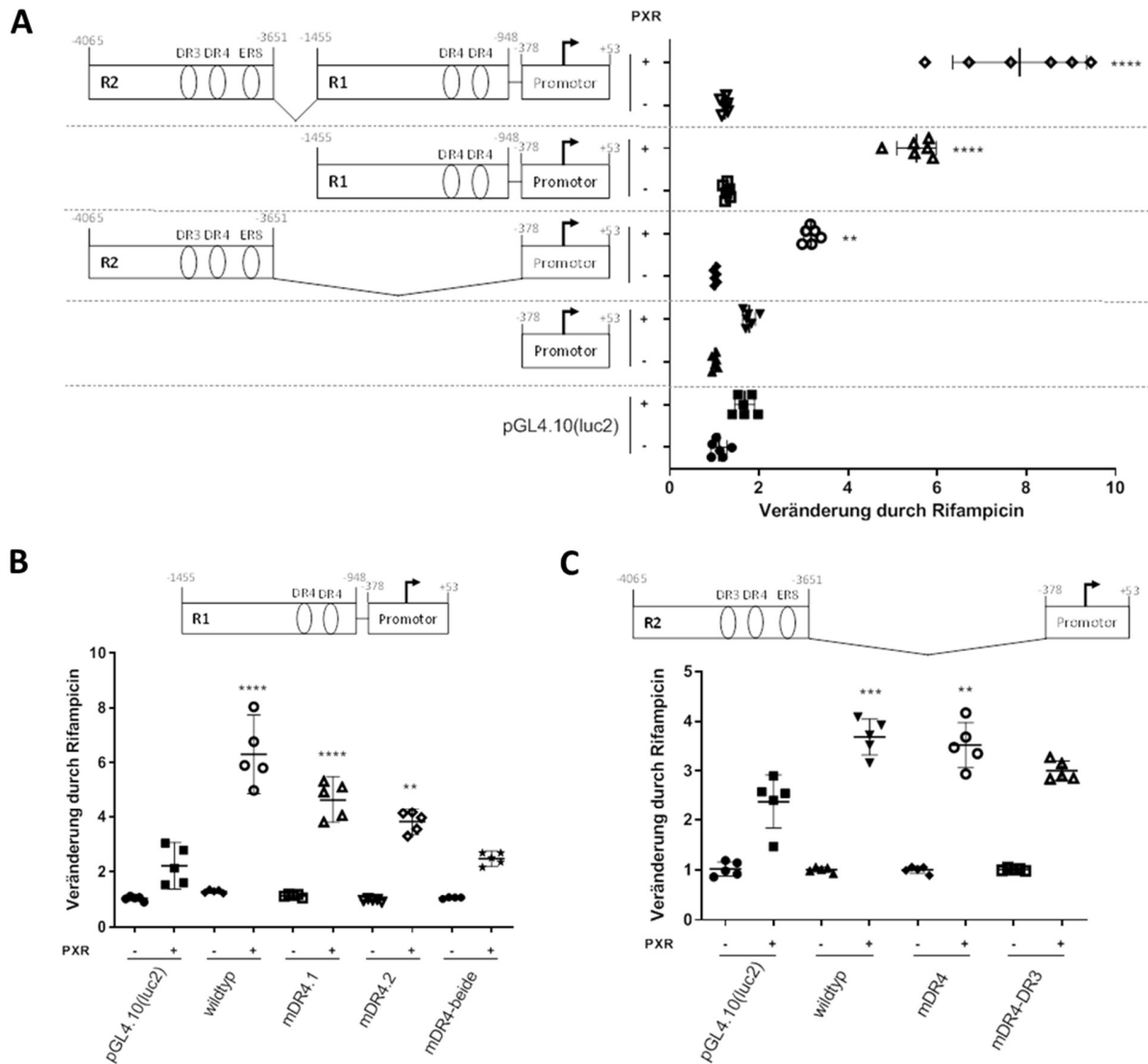


Abbildung 14: Darstellung der ETNPPL Enhancerregionen vor der ETNPPL eigenen Promotorregion und Mutation der PXR Bindemotive aus der R1- und R2-Region.

(A) Nach Transfektion der Reportergenplasmide der R1-R2-Region, der R1-Region, der R2-Region, dem Konstrukt ohne Enhancerregionen (Promotor) und dem Leervektor pGL4.10(luc2), sowie mit Kotransfektion der Expressionsplasmide für PXR und RXR α (+) oder dem leeren Expressionsvektor pcDNA3 und RXR α (-) in HepG2 Zellen wurde mittels Luciferase-Reportergenassay die Veränderung durch Rifampicin-Behandlung bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der 6 unabhängigen Experimente, durchgeführt in Triplikaten, mit 95% Konfidenzintervall nach Rifampicin-Behandlung. Die Auswirkungen der Rifampicin-Behandlung im Vergleich zum Leervektor (pGL4.10(luc2)) nach PXR Transfektion wurde mittels 1-way ANOVA untersucht und per Dunnett's multiple comparisons test auf multiples Testen korrigiert (**, $p \leq 0,01$; ****, $p \leq 0,0001$).

*(B) Nach Transfektion von HepG2 Zellen mit dem Reporterplasmid der R1-Region mit wildtypischen (wt) oder mutiertem (mDR4-1/mDR4-2/mDR4-beide) Bindemotiv, sowie der Kotransfektion von PXR und RXR α (+) bzw. dem leeren Expressionsvektor pcDNA3 und RXR α (-), wurde die Veränderung durch Rifampicin-Behandlung mittels Luciferase-Reporterassay bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der 5 unabhängigen Experimente, durchgeführt in Triplikaten, mit 95 % Konfidenzintervall nach Rifampicin-Behandlung. Die Auswirkung der Rifampicin-Behandlung im Vergleich zum Leervektor (pGL4.10(luc2)) nach PXR Transfektion wurde mittels 1-way ANOVA untersucht und per Dunnett's multiple comparisons test auf multiples Testen korrigiert (**, $p \leq 0,01$; ****, $p \leq 0,0001$).*

*(C) Nach Transfektion von HepG2 Zellen mit dem Reporterplasmid der R2-Region mit wildtypischen (wt) oder mutiertem (mDR4/mDR4-DR3) Bindemotiv, sowie der Kotransfektion von PXR und RXR α (+) bzw. dem leeren Expressionsvektor pcDNA3 und RXR α (-), wurde die Veränderung durch Rifampicin-Behandlung mittels Luciferase-Reporterassay bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der 5 unabhängigen Experimente, durchgeführt in Triplikaten, mit 95 % Konfidenzintervall nach Rifampicin-Behandlung. Die Auswirkung der Rifampicin-Behandlung im Vergleich zum Leervektor (pGL4.10(luc2)) nach PXR Transfektion wurde mittels 1-way ANOVA untersucht und per Dunnett's multiple comparisons test auf multiples Testen korrigiert (**, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$).*

Wie Abbildung 14B zeigt, gibt es nach Transfektion der Konstrukte in HepG2 Zellen und Mutation des ersten DR4-Motives (mDR4.1) der R1-Region eine 1,3-fachen Reduktion der Aktivität nach PXR Aktivierung im Vergleich zum Wildtyp. Die Mutation des zweiten DR4-Motives (mDR4.2) führt zu einer 1,5-fachen Reduktion, während die Doppelmutation beider DR4-Motive (mDR4-beide) zum vollständigen Verlust der Aktivität führt.

Die Transfektion der mutierten R2-Konstrukte in HepG2 Zellen zeigt eine leichte Reduktion der Aktivität nach PXR Aktivierung durch 10 μ M Rifampicin-Behandlung, was in Abbildung 14C dargestellt ist. Durch die Mutation des DR4-Motives (mDR4) kommt es zu keiner wesentlichen Veränderung der Aktivität. Im Vergleich zum Wildtyp verringert sich der Induktionsfaktor von 3,7-fach (Wildtyp) nur auf 3,5-fach (mDR4). Für die Doppelmutation des DR4-DR3-Motives (mDR4-DR3) kommt es zu einer Reduktion des Induktionsfaktors auf 3.

Da keine signifikante Veränderung der Induktion der Doppelmutation (mDR4-DR3) im Vergleich zum Leervektor festgestellt werden konnte, kann dies auf einen vollständigen Verlust der Aktivität (gleiches Level wie der Leervektor pGL4.10(luc2)) hindeuten.

Für die maximale Induktion sind beide Regionen (R1 und R2) und jeweils mehrere Bindemotive nötig.

4.4 Einfluss von PXR und LXR auf die Genexpression der Kennedy-Pathway Gene

Das durch PXR-Aktivierung die Regulation des ETNPPL-Gens beeinflusst wird, konnte im vorherigen Abschnitt gezeigt werden. Die Aktivierung von ETNPPL könnte Auswirkungen auf den CDP-Ethanolamin Syntheseweg haben, da es die Reaktion von Phosphoethanolamin zu Acetaldehyd, Ammoniak und Phosphat katalysiert. Ob PXR, neben der Regulation des ETNPPL, auch Einfluss auf die Aktivierung der anderen Gene dieses Synthesewegs hat soll in diesem Abschnitt mittels quantitativer Echtzeit-PCR untersucht werden.

Da neben PXR auch LXR an vielen Prozessen in der Leber, zum Beispiel der Lipidhomöostase, beteiligt ist, Heterodimere mit RXR bildet und an teilweise dieselben Bindemotive wie PXR bindet, sollte gleichzeitig die mögliche Regulation der CDP-Ethanolamin Syntheseweg-Gene durch LXR-Aktivierung untersucht werden.

ETNPPL (Abbildung 15A) weist eine um 3-4-fach erhöhte Genexpression nach PXR (10 μ M Rifampicin) und 3-fach erhöhte Genexpression nach LXR (2 μ M GW3965) Aktivierung für 24 h und 48 h auf. Aktivierung beider Transkriptionsfaktoren durch 1 μ M T0901317 führt zu einer additiven Erhöhung der Genexpression um das 8-fache, sowohl nach 24 h als auch nach 48 h. Bei ETNK2 (Abbildung 15C) führt die PXR Aktivierung durch Rifampicin bereits nach 24 h zu einer leichten, 1,3-fachen Herunterregulierung der Genexpression, die nach 48 h prominenter, um das 3-fache, zu erkennen ist. Für die LXR Aktivierung durch 2 μ M GW3965 ist keine Regulierung zu erkennen. Durch die Behandlung mit 1 μ M T0901317 wird die Genexpression wie durch Rifampicin nach 24 h und 48 h um das 1,4-3-fache herunterreguliert. Für PCYT2 (Abbildung 15D) zeigt keine der Behandlungen nach 24 h eine deutliche Auswirkung auf die Expression. Auch nach 48 h ist nur eine schwach Herunterregulierung nach Rifampicin-Behandlung zu vermuten, die durch die 1 μ M T0901317-Behandlung nicht bestätigt werden kann. 2 μ M GW3965 Behandlung zeigt auch nach 48 h keinen Einfluss auf die Genexpression. Eine 3-4-fach erhöhte Genexpression nach PXR Aktivierung durch Rifampicin zeigt sich auch bei SEC14L4 (Abbildung 15G). Nach Behandlung mit

1 μM T0901317 wird derselbe Expressionsspiegel erreicht, wie nach Rifampicin Behandlung. 2 μM GW3965-Behandlung zeigt keine Auswirkung auf die Genexpression. Für die Gene ETNK1 (Abbildung 15B), PCYT1a (Abbildung 15H) und CEPT1 (Abbildung 15E) kann auch nach 48 h weder mit Rifampicin-Behandlung noch für Behandlung mit GW3965 eine veränderte Genexpression gemessen werden. SMPDL3A (Abbildung 15F) und CYP3A4 (Abbildung 15K) dienen als Kontrollen. SMPDL3A wird sowohl durch 10 μM Rifampicin (PXR) als auch 2 μM GW3965 (LXR) reguliert. Behandlung mit 1 μM T0901317 führt zu einem additiven Effekt. CYP3A4 wird dagegen nur durch Behandlung mit 10 μM Rifampicin (PXR) reguliert. Der gemeinsame Agonist T0901317 erreicht nur denselben Expressionsspiegel wie die Rifampicin-Behandlung.

Ein signifikanter Einfluss auf die Genexpression durch PXR und/oder LXR konnte nur für ETNPPL, ETNK2 und SEC14L4 gezeigt werden.

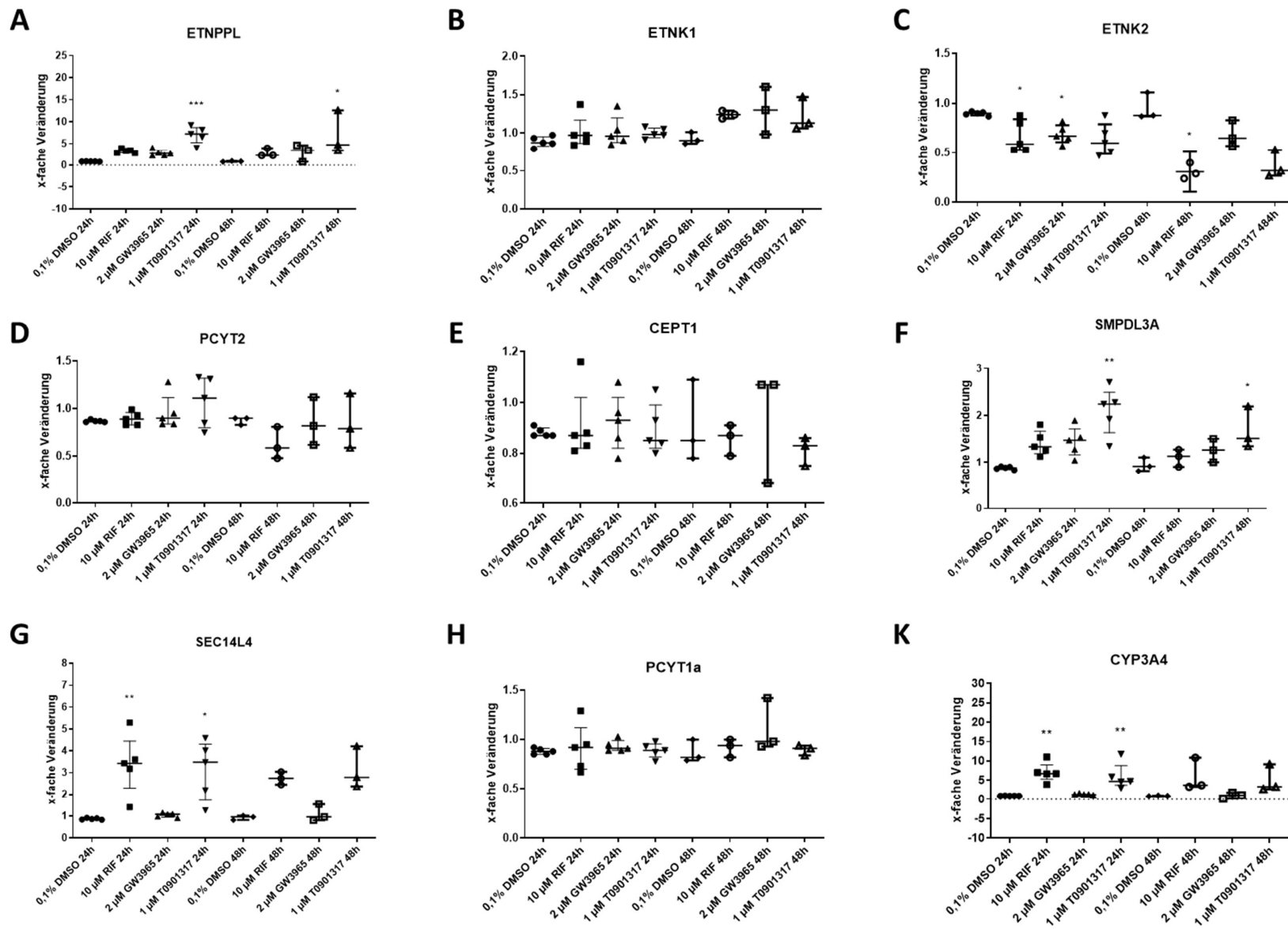


Abbildung 15: Einfluss von PXR und/oder LXR auf die Genexpression einiger Kennedy-Pathway Gene. 3-5 individuelle primäre humane Hepatozyten Kulturen wurden für 24 h (n = 5) oder 48 h (n = 3) mit 10 µM Rifampicin (PXR Agonist), 2 µM GW3965 (LXR Agonist), 1 µM T0901317 (PXR und LXR Agonist) oder 0,1% DMSO behandelt. Dargestellt ist der Median der 3-5 individuellen primären humanen Hepatozyten Kulturen, nach der jeweiligen Behandlung, gemessen mit quantitativer Echtzeit-PCR und mit Interquartilabständen. Untersucht wurden die Gene ETNPPL (A), ETNK1 (B), ETNK2 (C), PCYT2 (D), CEPT1 (E), SEC14L4 (G) und PCYT1a (H). SMPDL3A (F) und CYP3A4 (K) dienen als Positivkontrollen. Die Auswirkungen der jeweiligen Behandlung wurde mittels Friedman Test untersucht und über den Dunn's multiple comparisons test auf multiples Testen korrigiert (, p ≤ 0,05; **, p ≤ 0,01; ***, p ≤ 0,001).*

Da für ETNPPL festgestellt werden konnte, dass es neben PXR auch durch LXR reguliert wird, wurde der Einfluss von LXR auf die Aktivierung der ETNPPL Enhancerregionen (R1 und R2) mittels Reporterassay untersucht (Abbildung 16). In HepG2 Zellen ist bereits endogenes LXR, sowie endogene Liganden für LXR vorhanden, daher ist die Basalaktivität der kombinierten Regionen (R1-R2) bereits ohne gezielte Transfektion von LXR und Behandlung mit GW3965 um etwa 30-fach im Vergleich zur jeweiligen Leervektor-Kontrolle erhöht. Nach Zugabe von 2 µM GW3965 ohne LXR Transfektion ist eine Steigerung um 4,2-fach zu erkennen, die nach LXR Transfektion, ohne gezielte Aktivierung durch GW3965 um 44,4- (LXR β) bis 58,4-fach (LXR α) erhöht ist. Am höchsten ist die Aktivität nach LXR Transfektion und Behandlung mit GW3965, sowohl für LXR α als auch LXR β , mit einer um 90- (LXR β) bis 108,3-fach (LXR α) erhöhten Aktivität. Ein signifikanter Unterschied zwischen LXR α und LXR β ist nicht zu erkennen.

Das lässt darauf schließen, dass LXR dieselben Regionen des ETNPPL-Gens wie PXR aktiviert.

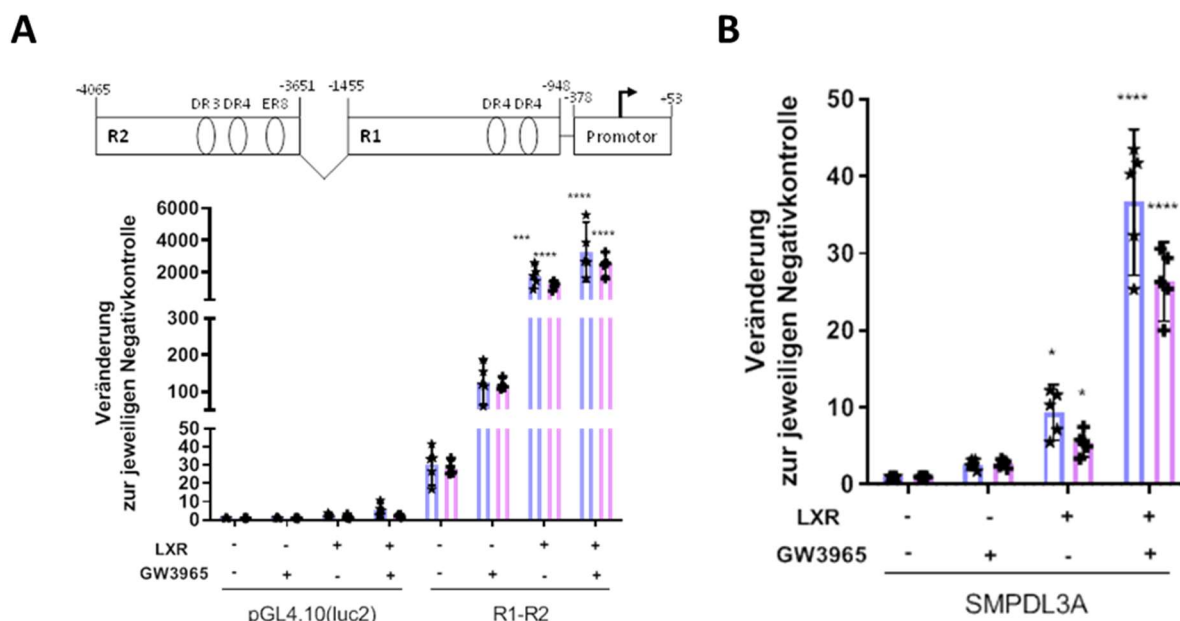


Abbildung 16: LXR-abhängige Regulation der kombinierten ETNPPL Enhancerregion R1-R2.

(A) Nach Kotransfektion von HepG2 Zellen mit dem Reportergenplasmid LXR α (blau *) oder LXR β (pink +) (+) bzw. dem leeren Expressionsvektor pcDNA3 mit RXR α (-) und Behandlung mit 2 μ M GW3965 (+) oder 0,1% DMSO (-) für 24 h wurde die Aktivität mittels Luciferase-Reportergenassay ermittelt. Die normalisierten Reportergenaktivitäten von 5 unabhängigen Experimenten bezogen auf die jeweilige Negativkontrolle (-/-) sind als Balken mit 95% Konfidenzintervall dargestellt. Die Auswirkungen der LXR Transfektion und/oder der GW3965-Behandlung wurden mittels 1-way ANOVA untersucht und mit dem Dunnett's multiple comparisons test auf multiples Testen korrigiert (*, $p \leq 0,05$; ***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$).

(B) Als Positivkontrolle wurde das Reportergenplasmid pGL3-Tk(SMPDL3A-LXRE) verwendet. Die Auswirkungen der LXR Transfektion und/oder der GW3965-Behandlung wurden mittels 1-way ANOVA untersucht und mit dem Dunnett's multiple comparisons test auf multiples Testen korrigiert (*, $p \leq 0,05$; ***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$).

4.5 PXR Aktivierung führt zu einer Reduktion der Phosphoethanolaminkonzentration in primären Hepatozyten

Mittels Triple Quadrupol LC-MS-MS-System mit JetStream Electrospray-Quelle und Ion Funnel (LC-ESI-MS/MS) wurden die Metabolite von Ethanolamin aus dem CDP-Ethanolamin Syntheseweg, sowie das Produkt Phosphatidylethanolamin (PE), untersucht.

Phosphoethanolamin, dass durch die Ethanolaminkinase aus Ethanolamin synthetisiert wird, konnte als einziger Metabolit gemessen werden.

Beispielhafte MS-Peaks sind in Abbildung 17 zu sehen.

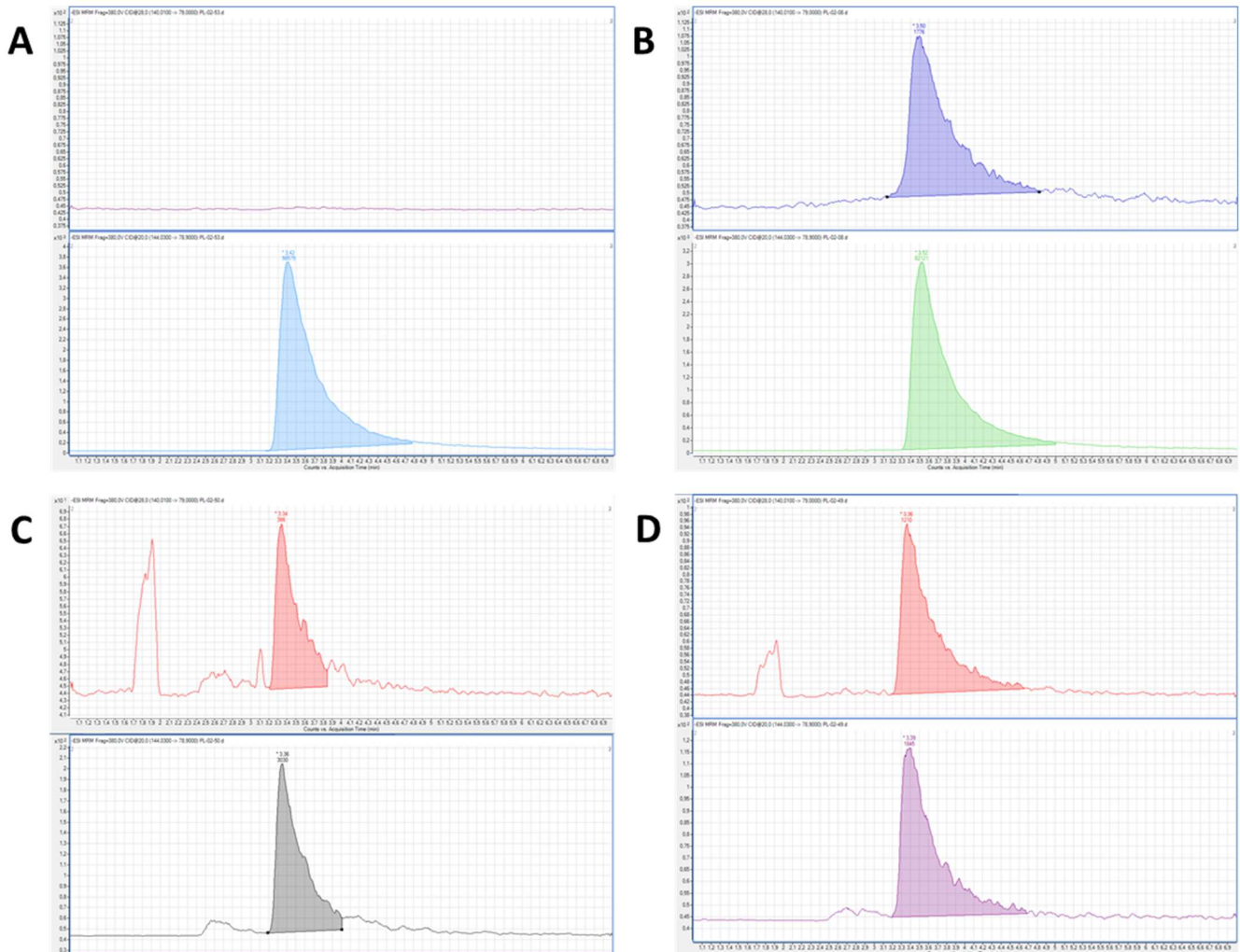


Abbildung 17: Beispielhafte MS-Peak eines Leerwerts, des ersten Eichpunkts und des Phosphoethanolamins mit jeweiligem Internen Standard (unten) nach der Messung mittels LC-ESI-MS/MS.

(A) Dargestellt ist ein beispielhafter MS-Peak der Leerwert-Messung. Als Messkontrolle wurde Methanol:Acetonitril:Wasser (2:2:1) eingesetzt (oben) und der Interne Standard (unten) ergab sich aus d_4 -markiertem Phosphoethanolamin.

(B) Dargestellt ist ein beispielhafter MS-Peak der Messung des ersten Eichpunkts (EP1, oben) mit 6,25 pmol/mL. Der Interne Standard (unten) ergab sich aus d_4 -markiertem Phosphoethanolamin.

(C) Dargestellt ist ein beispielhafter MS-Peak der Messung von Phosphoethanolamin nach Behandlung von primären Hepatozyten mit 25 μ M Ethanolamin und 10 μ M Rifampicin über 48 h (oben). Die Konzentration betrug 329 pmol/mL. Der Interne Standard (unten) ergab sich aus d_4 -markiertem Phosphoethanolamin.

(D) Dargestellt ist ein beispielhafter MS-Peak der Messung von Phosphoethanolamin nach Behandlung von primären Hepatozyten mit 25 μM Ethanolamin und 0,1 % DMSO über 48 h (oben). Die Konzentration betrug 1746 pmol/mL. Der Interne Standard (unten) ergab sich aus d_4 -markiertem Phosphoethanolamin.

Die primären Hepatozyten-Kulturen wurden mit 25 μM Ethanolamin (n = 2, grüne Punkte) / d_4 -markiertem Ethanolamin (n = 1, blaue Quadrate) und mit 10 μM Rifampicin, 1 μM T0901317 (n = 1) oder 0,1% DMSO über 48 h behandelt. Wie in Abbildung 18A zu sehen, gibt es eine deutliche Reduktion der Phosphoethanolaminkonzentration in mit Rifampicin behandelten Proben. Auch T0901317 scheint zu einer deutlichen Abnahme der Konzentration an Phosphoethanolamin zu führen.

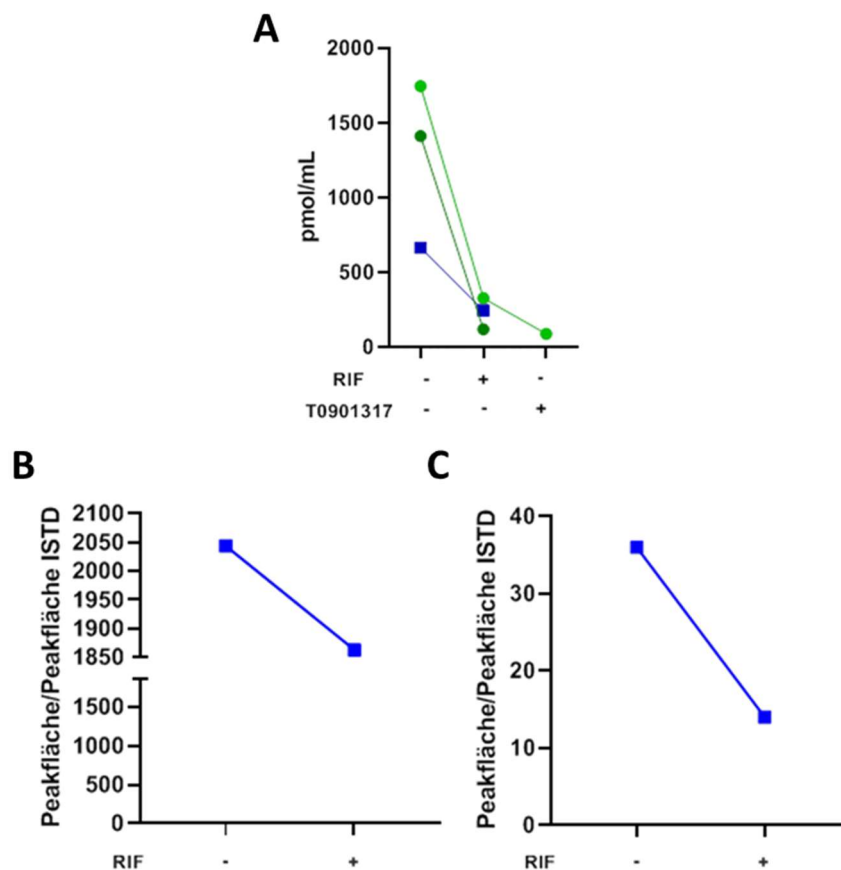


Abbildung 18: Rifampicin-induzierte Reduktion der Phosphoethanolaminkonzentration und der Peakflächensumme der PEs und LPEs.

(A) Primäre humane Hepatozyten wurden mit 25 μM Ethanolamin (n = 2, grüne Punkte) / d_4 -markiertem Ethanolamin (n = 1, blaue Quadrate) und 10 μM Rifampicin (RIF) oder 1 μM T0901317 (n = 1) für 48 h behandelt und die Konzentration des Phosphoethanolamin im Vergleich zum Internen Standard (ISTD) in pmol/mL mittels LC-ESI-MS/MS ermittelt.

(B) Primäre Hepatozyten wurden mit 25 μM d_4 -markiertem Ethanolamin und 10 μM Rifampicin (RIF) für 48 h behandelt und die Peakfläche der Summe aller gemessenen Phosphatidylethanolamin-Spezies (PE) im Vergleich zur Peakfläche des Internen Standards (ISTD, PE 34:0) mittels LC-ESI-MS/MS ermittelt. Dargestellt sind die Flächen der mit d_4 -markiertem PEs nach Rifampicin (RIF, +)- oder DMSO (-)-Behandlung (blaue Quadrate) eines einzelnen Experiments.

(C) Primäre Hepatozyten wurden mit 25 μM d_4 -markiertem Ethanolamin und 10 μM Rifampicin (RIF) für 48 h behandelt und die Peakfläche der Summe aller gemessenen Lyso-Phosphatidylethanolamin-Spezies (LPE) im Vergleich zur Peakfläche des Internen Standards (ISTD, LPE 17:1) mittels LC-ESI-MS/MS ermittelt. Dargestellt sind die Flächen der mit d_4 -markiertem LPEs nach Rifampicin (RIF, +)- oder DMSO (-)-Behandlung (blaue Quadrate) eines einzelnen Experiments.

Der Einfluss von Rifampicin auf die Neusynthese des PE wurde in einem Pilotversuch durch Zugabe von d_4 -markiertem Ethanolamin zu Beginn der Behandlung untersucht. Abbildung 18B zeigt, dass die Summe der Peakflächen der PE-Spezies mit Rifampicin-Behandlung abnimmt ($n = 1$). Dasselbe wird auch für die Lyso-PEs (LPEs) in Abbildung 18C gezeigt ($n = 1$). Aus welchen PE- oder LPE-Spezies die Summe berechnet wurde, ist in Tabelle 8 verzeichnet.

Tabelle 8 Auflistung der gemessenen PE- und LPE-Spezies (+) im direkten Vergleich zwischen Rifampicin- (RIF) und DMSO-Behandlung, sowie mit und ohne d_4 -Markierung. (-) symbolisiert die Spezies, die mit dieser Behandlung nicht messbar war.

d_4-PE	32:1	34:1	34:2	36:1	36:2	36:3	36:4	36:5	36:6	38:2	38:3	38:4	38:5	38:6	38:7	40:4	40:5	40:6	40:7
RIF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
DMSO	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

d_4-LPE	16:0	18:0	18:1	20:4
RIF	+	-	+	-
DMSO	+	+	-	+

4.6 Induktion der SEC14L4 Expression durch PXR Aktivierung auf RNA Ebene

Aus der Genom-weiten Genexpressionsanalyse von Kandel und Kollegen (Kandel et al., 2016) wurde neben ETNPPL auch SEC14L4 für weitere Analysen ausgewählt, da es ebenfalls in Beziehung zum Phospholipidstoffwechsel stehen könnte und durch Rifampicin-Behandlung hochreguliert wird.

Die PXR-Abhängigkeit der Induktion der Genexpression von SEC14L4 durch Rifampicin wurde durch Kombination aus siRNA-vermitteltem Knockdown und quantitativer Echtzeit-PCR nachgewiesen. Abbildung 19 zeigt die Genexpression von SEC14L4 nach Messung von RNA-Proben von 9 verschiedenen primären Hepatozyten nach PXR-Aktivierung (Rifampicin) oder -Knockdown (siPXR). Die Genexpression von SEC14L4 ist nach Rifampicin-Behandlung um das 5-fache erhöht. Herunterregulierung des PXR durch siRNA-vermittelten Knockdown hat keine Induktion zur Folge.

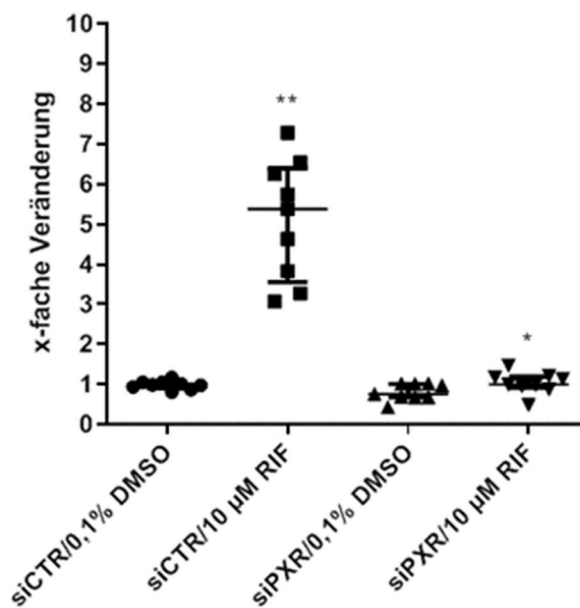


Abbildung 19: Die Induktion der Genexpression von SEC14L4 durch Rifampicin ist PXR-abhängig.

Die Genexpression wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR-Messung von 9 individuellen primären humanen Hepatozyten RNAs, behandelt mit 10 µM Rifampicin oder 0,1% DMSO, in Kontrollzellen (siCTR) oder PXR-Knockdown Zellen (siPXR), nach 24 h ermittelt. Der Median mit Interquartilabständen für die einzelnen Messwerte ist dargestellt. Die Auswirkungen der Rifampicin-Behandlung im Vergleich zur entsprechenden DMSO Behandlung wurde mittels Wilcoxon matched-paires signed rank test untersucht (*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$).

4.7 Bindung von PXR an spezifische Motive von SEC14L4 oberhalb und unterhalb des Promoters

Auch für SEC14L4 wurde, wie schon für ETNPPL zuvor, durch den direkten Vergleich von PXR-Knockdown und den Kontrollzellen gezeigt, dass SEC14L4 PXR-abhängig induziert wird. Für SEC14L4 wurden 10 genomische Regionen mit potenziellen PXR-Bindestellen, 6 davon 3' unterhalb (Abbildung 20A) und 4 davon 5' oberhalb (Abbildung 23A) des ersten Exons mittels *in silico* Genomanalysen mit NubiScan V2.0 (M. Podvinec; University of Basel, 2021) und DNASTAR GeneQuest ermittelt.

Wie auch schon für ETNPPL wurden die jeweiligen Regionen mittels PCR amplifiziert, in den Leervektor pGL3-Tk(-105) kloniert und mittels Luciferase-Reporterassay nach 24 h Rifampicin-Behandlung auf ihre Aktivität nach PXR-Aktivierung durch Rifampicin untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20B dargestellt. Dabei wurde eine PXR-abhängige Hochregulierung der SE5-Region um das 1,8-fache (SE5) im Vergleich zum Leervektor gemessen.

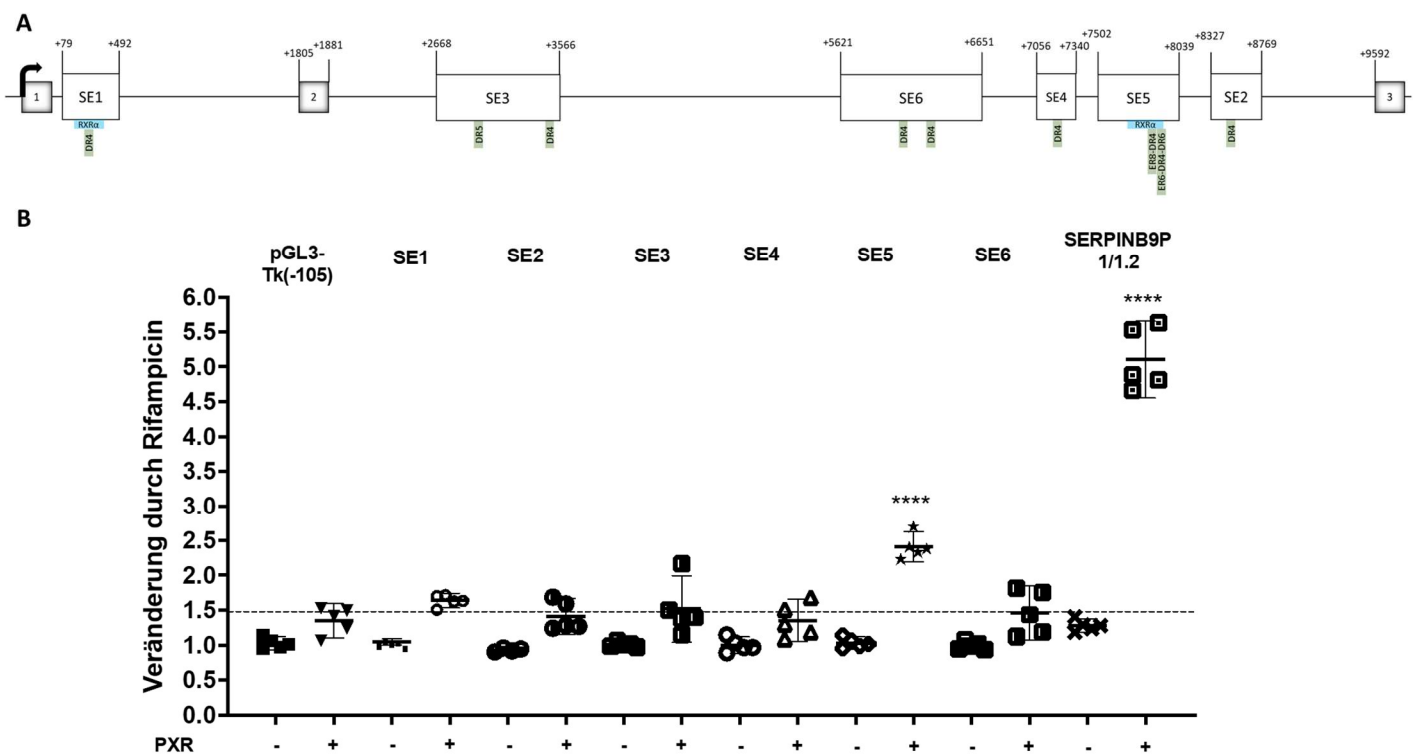


Abbildung 20: Identifizierung von der potenziellen Region 3' unterhalb des ersten Exons von SEC14L4, die PXR-abhängig reguliert werden

(A) Schema aller identifizierten Regionen mit möglichen PXR Bindemotiven 3' unterhalb des ersten Exons von SEC14L4.

(B) Die identifizierten Regionen wurden in den Leervektor pGL3-Tk(-105) kloniert und jeweils zusammen mit den Expressionsplasmiden von PXR und RXR α (+) bzw. dem leeren Expressionsvektor pcDNA3 und RXR α (-) in HepG2 Zellen kotransfiziert. Mittels Luciferase-Reporterassay wurde die Veränderung durch Rifampicin-Behandlung bestimmt. Das PXR-abhängige Reportergenkonstrukt der Intron Region des SERPINB9P1/1.2 wurde als Positivkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte der 5 unabhängigen Experimente, durchgeführt in Triplikaten, mit 95 % Konfidenzintervall nach Rifampicin-Behandlung. Die Auswirkung der Rifampicin-Behandlung auf die Aktivität der Reportergenplasmide im Vergleich zum Leervektor (pGL3-Tk(-105)) nach PXR Transfektion (+PXR) wurde mittels 1-way ANOVA untersucht und mittels Dunnett's multiple comparisons test auf multiples Testen korrigiert (****, $p \leq 0,0001$) (Kent et al., 2002b).

Die SE5-Region befindet sich 7637 bp unterhalb des ersten Exons und weist ein DR6-, ein ER6-DR4-, ein ER8 und ein DR4-Motiv auf, wie in Tabelle 9 zu sehen. Außerdem zeigt der UCSC Genome Browser, wie in Abbildung 21 zu sehen, für diese Region eine RXR α Bindestelle an, die sich in der direkten Nähe des DR4-Motivs befinden soll (Kent et al., 2002b). Da RXR α sowohl Homo- als auch Heterodimere bildet, kann diese Bindestelle auf die Heterodimerisierung von RXR mit PXR hindeuten. Alle anderen PXR-Bindemotive dieser SE5-Region liegen oberhalb der RXR α -Bindestelle.

Tabelle 9: Detaillierte Beschreibung der gefundenen PXR-Bindemotive für die SE5-Region 3' unterhalb des ersten Exons des SEC14L4 Gens.

Dargestellt sind die potenziellen PXR-Bindemotive für die SE5-Region mit ihrer Position auf dem Chromosom 22 (AC004832.3) und der prozentualen Übereinstimmung der Sequenz mit dem Konsensus aus GeneQuest (DNASTAR). Die Sequenz zeigt die Lage der PXR-Bindemotive zueinander und zur ungefähren Lage der potenziellen RXR α -Bindestelle (der rote Buchstabe markiert vermutlich das Zentrum der Bindestelle).

Region	PXR-Bindemotive	Position im AC004832.3	NubiScan-RAW-Score (Threshold = 0,7)	GeneQuest
SE5 (106144-106734)	DR6	106316-106333	-	100%
	DR4-ER6	106328-106343/45	-	88%/89%
	ER8	106345-106364	-	90%
	DR4	106359-106374	-	88%



Die in der SE5-Region auftretenden Methylierungen der Lysine des Histon 3 weisen auf transkriptionell aktives Chromatin hin (siehe Abbildung 21).

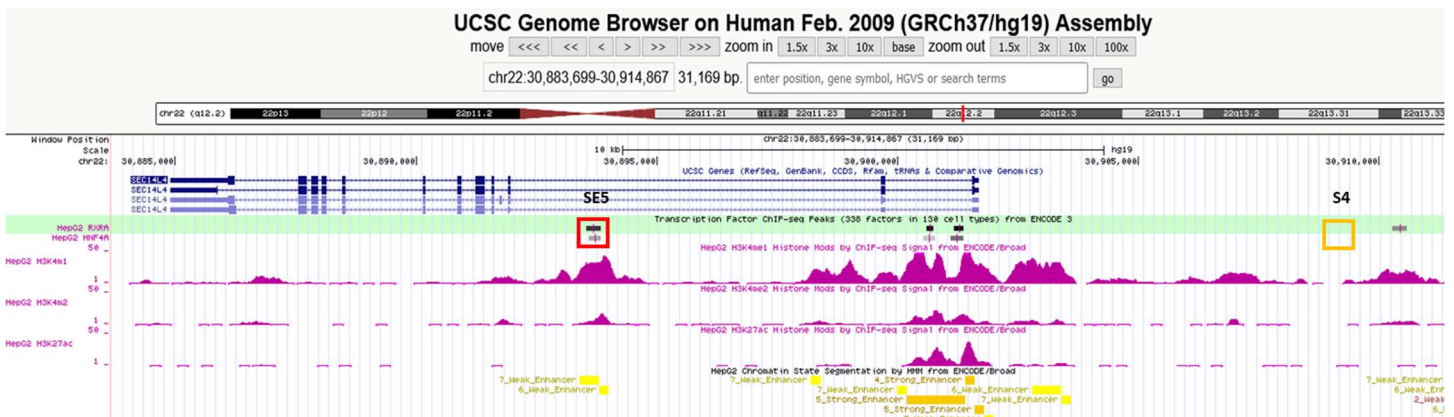


Abbildung 21: Auszug des auf Chromatin 22 liegenden SEC14L4 aus dem UCSC Genome Browser.

Dargestellt ist die Lage der PXR-abhängig regulierten Regionen mit potenziellen PXR-Bindestellen 3' unterhalb oder 5' oberhalb des ersten Exons, sowie die RXR α - und HNF4 α -Bindestellen, die Positionen der Histonmodifikationen und die Aufteilung des Chromatinzustands in HepG2 Zellen. Die SE5-Region unterhalb des ersten Exons (rote Quadrate) des SEC14L4 weisen eine RXR α -Bindestelle (grün hinterlegt) auf, während die S4-Region (oranges Quadrat) oberhalb des ersten Exons keine RXR α -Bindestelle und keine eindeutigen Histonmodifikationen aufweist (Kent et al., 2002b).

Nach erfolgter Identifizierung der PXR-abhängig regulierten Regionen 3' unterhalb des ersten Exons (SE5) wurden die dort befindlichen potenziellen PXR Bindestellen *in vitro* mittels *Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay* (EMSA) auf PXR-Bindung untersucht.

Die potenziellen PXR Bindestellen der SE5-Region (Abbildung 22B) zeigen alle einen Bandenshift nur bei PXR/RXR α Heterodimer-Bildung.

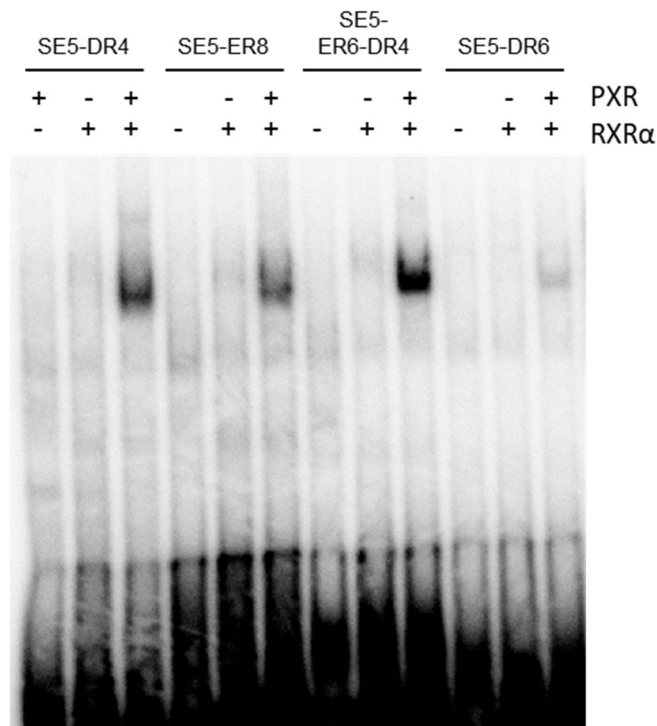


Abbildung 22: Untersuchung der PXR-Bindestellen der SE5-Region von SEC14L4 mittels EMSA.

Dargestellt ist der als Pilotversuch durchgeführte EMSA. Verwendet wurde *in vitro* translatiertes PXR und/oder RXR α , sowie die Oligonukleotide, welche das radioaktiv markierte DR4-, ER8-, ER6-DR4- oder DR6-Motiv der SE5-Region enthalten. Eine Bindung an das entsprechende Motiv ist nur mit PXR/RXR α -Heterodimer zu sehen ($n = 1$).

Das ER6-DR4-Motiv der SE5-Region weist die stärkste und das DR6-Motiv nur eine schwache Bande auf.

Alle identifizierten Bindestellen der SE5-Region gehen, wenn auch teilweise nur schwach, eine Bindung mit PXR/RXR α ein.

Die Untersuchung der 3' oberhalb des ersten Exons von SEC14L4 gefundenen vier Regionen mit potenziellen PXR-Bindestellen, schematisch dargestellt in Abbildung 23A, mittels Luciferase-Reporterassay ergibt eine signifikante Hochregulierung nur für die S4-Region (siehe Abbildung 23B). Für die S4-Region ist die Aktivität 1,4-fach höher als für den Leervektor.

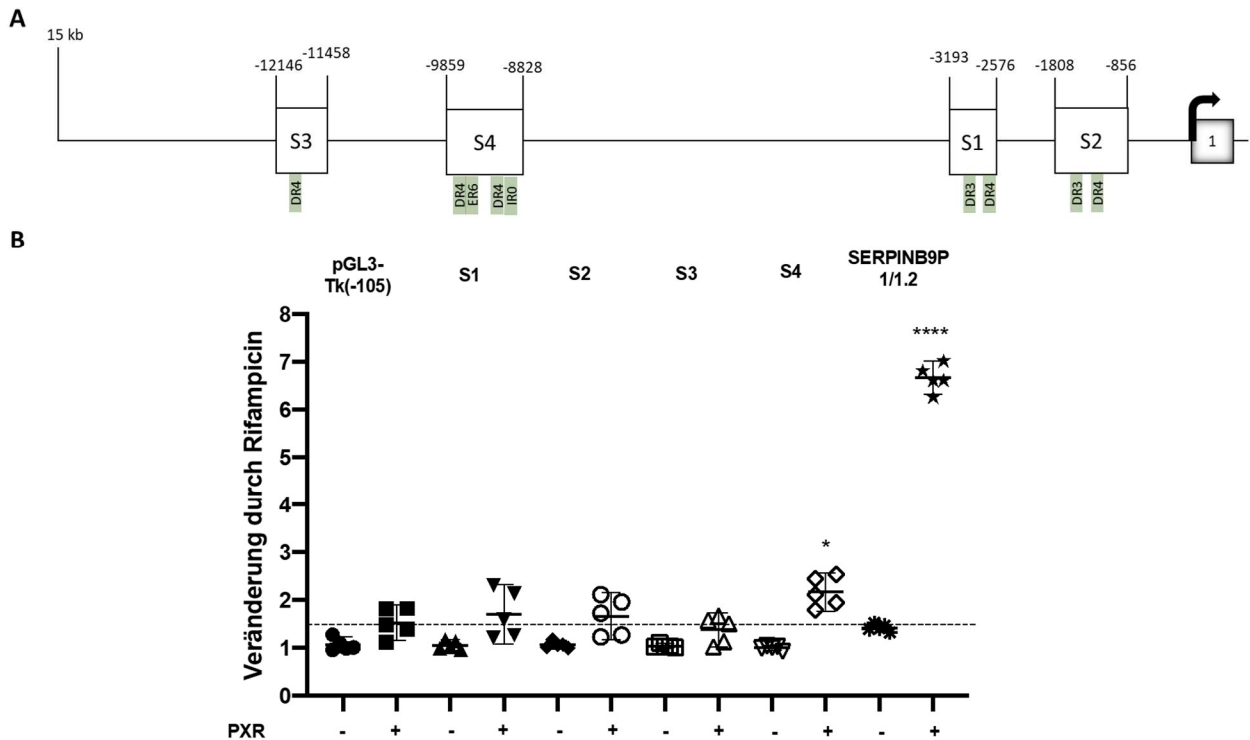


Abbildung 23: Identifizierung von potenziellen Regionen 5' oberhalb des ersten Exons von SEC14L4, die PXR-abhängig reguliert werden.

(A) Schema aller identifizierten Regionen mit möglichen PXR Bindemotiven oberhalb des ersten Exons von SEC14L4.

(B) Die identifizierten Regionen wurden in den Leervektor pGL3-Tk(-105) kloniert und jeweils zusammen mit den Expressionsplasmiden von PXR und RXR α (+) bzw. dem leeren Expressionsvektor pcDNA3 und RXR α (-) in HepG2 Zellen kotransfiziert. Mittels Luciferase-Reporterassay wurde die Veränderung durch Rifampicin-Behandlung bestimmt. Das PXR-abhängige Reportergenkonstrukt der Intron Region des SERPINB9P1/1.2 wurde als Positivkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte der 5 unabhängigen Experimente, durchgeführt in Triplikaten, mit 95% Konfidenzintervall nach Rifampicin-Behandlung. Die Auswirkung der Rifampicin-Behandlung auf die Aktivität der Reportergenplasmide im Vergleich zum Leervektor (pGL3-Tk(-105)) nach PXR Transfektion (+PXR) wurde mittels 1-way ANOVA untersucht und mittels Dunnett's multiple comparisons test korrigiert (*, $p \leq 0,05$; ****, $p \leq 0,0001$).

Die S4-Region befindet sich -8828 bp oberhalb des ersten Exons.

Hier befinden sich zwei DR4-, ein ER6- und ein IRO-Motiv, wie in Tabelle 10 aufgelistet.

Wie Abbildung 21 zeigt, weist die oberhalb des ersten Exons liegende S4-Region keine RXR α -Bindestelle und auch weder Methylierungen noch Acetylierungen der Lysine des Histon 3 auf.

Tabelle 10: Detaillierte Beschreibung der identifizierten PXR-Bindemotive für die S4-Region 5' oberhalb des ersten Exons des SEC14L4 Gens.

Dargestellt sind die potenziellen PXR-Bindemotive der S4-Region mit ihrer Position auf dem Chromosom 22 (AC004832.3) und dem jeweiligen RAW-Score aus NubiScan und/oder der prozentualen Übereinstimmung der Sequenz mit dem Konsensus aus GeneQuest (DNASTAR).

Regionen	PXR-Bindemotive	Position auf Chromosom 22	NubiScan-RAW-Score (Threshold = 0,7)	GeneQuest
S4 (123197-124227)	DR4-1	123928-123943	0,85	94%
	ER6	123822-123839	0,76	-
	DR4-2	123506-123521	-	94%
	IRO	123389-123400	0,70	-

Für die oberhalb des ersten Exons liegenden Regionen von SEC14L4 wurden keine EMSAs durchgeführt.

5 Diskussion

Diese Arbeit behandelt die molekularen Mechanismen der Regulation von ETNPPL und SEC14L4 durch PXR und die metabolischen Konsequenzen der Regulation von ETNPPL auf den CDP-Ethanolamin Syntheseweg, der als Teil des Kennedy-Pathway für die Neusynthese des Membranphospholipids Phosphatidylethanolamin (PE) zuständig ist.

Mit den hier beschriebenen Ergebnissen wird gezeigt, dass sowohl die ETNPPL Expression als auch die SEC14L4 Expression durch PXR Aktivierung induziert wird. Zudem wurden 2 PXR-abhängige Enhancerregionen des ETNPPL definiert. Durch Liganden-vermittelte Aktivierung von PXR und LXR konnte gezeigt werden, dass die ETNPPL Expression sowohl durch PXR als auch LXR induziert wird, während SEC14L4 selektiv durch PXR induziert wird.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine PXR Aktivierung durch Rifampicin zu einer Reduktion der Phosphoethanolaminkonzentration in primären Hepatozyten führt, was auf die erhöhte ETNPPL Expression zurückgeführt werden kann. Auch die erniedrigte Expression von ETNK2 könnte, sofern sich diese auf die Proteinmenge auswirken sollte, zur Reduktion der Phosphoethanolaminkonzentration beitragen. Das würde bedeuten, dass PXR an zwei Stellen Einfluss auf die PE-Synthese nimmt. Der durchgeführte Pilotversuch lässt vermuten, dass eine Rifampicin-Behandlung tatsächlich zu einer Reduktion der PE-Konzentration führt.

Der Fokus dieser Arbeit lag beim ETNPPL, dessen physiologische Funktion noch nicht genauer untersucht wurde und von dem nur die Reaktion bekannt ist, die es katalysiert (Phosphoethanolamin zu Acetaldehyd, Ammoniak und Phosphat, (Flehood & Pitot, 1970)). Dadurch konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass das ETNPPL mit dem Phospholipidstoffwechsel und dem Kennedy Pathway in Verbindung steht, in dem das Phosphoethanolamin einen wichtigen Metaboliten darstellt.

Auch das SEC14L4 kann eventuell mit dem Kennedy Pathway in Verbindung gebracht werden, da dies für das Sec14p in der Hefe bereits experimentell gezeigt wurde.

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten, wollten wir die PXR-abhängige Regulation von SEC14L4 nachweisen und die regulatorischen Mechanismen genauer untersuchen.

5.1 Regulation von ETNPPL in Leberzellen

Dass ETNPPL (AGXT2L1) durch Rifampicin-Behandlung hochreguliert wird, haben bereits Kandel und Kollegen gezeigt (Kandel et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit wurde durch siRNA-vermittelten PXR Knockdown belegt, dass diese Regulation PXR abhängig ist. Die PXR-abhängige Induktion konnte sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung der fünf *in silico* identifizierten Regionen mit potenziellen PXR-Bindestellen, konnte gezeigt werden, dass zwei Regionen (R1 und R2) im Reporterassay als Rifampicin-abhängige Enhancer fungieren. Alle Reporterassays wurden mit PXR und RXR α Kotransfektion durchgeführt, da dies zu einer höheren Basalaktivität führte. Zwar ist bereits endogenes RXR α in den Zellen enthalten, dieses ergab aber nur eine schwache Basalaktivität, die sich durch zusätzliche Transfektion von RXR α erhöhen ließ.

Mittels EMSA wurde die Interaktion von PXR mit den PXR-Bindestellen der Enhancerregionen von ETNPPL und SEC14L4 untersucht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass PXR nur als Heterodimer mit RXR α an die Bindestellen bindet.

RXR α hat als Heterodimer mit anderen Kernrezeptoren, wie PXR oder LXR, Einfluss auf viele verschiedene biologische Synthesewege. Als Homodimer bindet RXR α vor allem an DR1-Motive und hat so ebenfalls das Potential unabhängig Prozesse zu regulieren (Szanto et al., 2004).

Durch die EMSA-Analyse konnte gezeigt werden, dass in der R1-Region das DR4-2-Motiv und in der R2-Region das DR3-Motiv am stärksten durch PXR/RXR α gebunden wird. Der direkte Vergleich des DR3-Motivs der R2-Region mit den DR4-Motiven der R1-Region zeigt, dass die Motive der R1-Region eine deutlich stärkere Bindung mit PXR einzugehen scheinen (Abbildung 11A).

Die mittels EMSA *in vitro* gezeigte Interaktion des PXR mit der R1-Region konnte auch *in vivo* mittels CHIP gezeigt werden. Damit wurde die direkte Regulation von ETNPPL durch PXR bestätigt. Allerdings konnte auf Grund der stark abweichenden Ct-Werte und einer schwachen, unspezifischen Bindung des Kontrollantikörpers an die R1-Region des ETNPPL beziehungsweise der entsprechenden Region im Intron 1 des SMPDL3A (Positivkontrolle), keine quantitative Auswertung vorgenommen werden. Die Analyse zeigt aber, dass es zu einer Bindung von PXR auch in Abwesenheit des Liganden (RIF) an die R1-Region des ETNPPL Gens

kommt, welche durch Zugabe des Liganden nicht weiter verstärkt wird. Bereits für andere PXR Zielgene, zum Beispiel SMPDL3A oder CYP3A4, wurde beschrieben, dass eine Chromatinbindung von PXR an die jeweilige Region auch in Abwesenheit des Liganden erfolgte (Jeske et al., 2017; Frank et al., 2005).

Um vergleichbare Bedingungen für alle Regionen zu schaffen, wurde die Enhanceraktivität der einzelnen Regionen mit dem Tk-Promotor untersucht.

Durch die Aktivitätsmessung der R1- und R2-Region kloniert vor den ETNPPL Promotorbereich, wurde gezeigt, dass die Aktivität der Regionen nach PXR-Aktivierung unabhängig vom Tk-Promotor ist. Der exakte Transkriptionsstart wurde hier nicht experimentell ermittelt. Etwa 24 bp vor Beginn des ersten Exons befindet sich eine potenzielle TATA-Box. Dies deutet darauf hin, dass der in den Datenbanken beschriebene Anfang des ersten Exons auch der korrekte Startpunkt der Transkription sein dürfte.

Die Untersuchung der R1- und R2-Konstrukte vor dem ETNPPL Promotorbereich mittels Reporterassay bestätigte, dass die R1-Region eine höhere Aktivität aufweist als die R2-Region. Damit scheint die R1-Region eine größere Bedeutung für die Regulierung der ETNPPL Expression durch PXR zu haben. Der additive Effekt beider Regionen zusammen (R1-R2), sowie die Reduktion der Aktivität auf das Niveau des Leervektors durch das Konstrukt ohne die Enhancerregionen (Promotor) zeigen, dass beide Regionen eine Rolle bei der Regulierung spielen.

Damit wurden zwei PXR-abhängige Enhancerregionen identifiziert, deren Aktivität, nicht nur mit dem Tk-Promoter, sondern auch mit dem ETNPPL eigenen Promoter nachweisbar ist (Abbildung 14A).

Mittels Mutationsanalyse der einzelnen PXR-Bindemotive konnten durch weitere Reporterassays die Ergebnisse der EMSA bestätigt werden. Somit hat das DR4-2-Motiv der R1-Region eine höhere Bedeutsamkeit für die Induktion durch PXR. Doch nur durch Mutation beider DR4-Motive gleichzeitig konnte die Aktivität auf das Niveau des Leervektors gesenkt werden (Abbildung 14B). Bei der R2-Region führte nur die Doppelmutation des DR3- mit dem DR4-Motiv zu einer deutlichen Reduktion der Aktivität. Da der p-Wert nur knapp über 0,05 liegt, kann ein Einfluss des nicht überprüften ER8-Motivs nicht ausgeschlossen werden. Dieses Motiv ergab im EMSA nur eine sehr schwache Bande, weshalb es keiner Mutationsanalyse unterzogen wurde.

Die Stärke des EMSA ist, dass es die direkte Bindung eines Proteins an eine spezielle DNA-Sequenz demonstriert. Dabei ist der größte limitierende Faktor, dass der gesamte Versuch *in vitro* stattfindet und somit nicht automatisch die Situation *in vivo* oder auch im Reporterassay widerspiegelt.

Auch LXR beeinflusst die *de novo* Lipogenese in der Leber und bildet, wie auch PXR, Heterodimere mit RXR α , um an DR4-Motive zu binden (Cave et al., 2016). Santinha und Kollegen zeigten bereits, dass die ETNPPL Expression in primären humanen Hepatozyten durch LXR-Aktivierung hochreguliert wird. Hier wurden ebenfalls zwei potenzielle LXR-Bindestellen auf dem ETNPPL Gen postuliert. Diese sollen sich bei ca. 9,3 kb oberhalb des ersten Exons und im Intron 5 befinden und weisen jeweils nur eine Abweichung von der Konsensus DR4-Bindestelle auf (Santinha et al., 2020). Allerdings haben die Autoren diese Bindestellen nicht experimentell bestätigt, so dass die Relevanz für die Regulation unklar ist.

Mit der durchgeführten quantitativen Echtzeit-PCR konnte bestätigt werden, dass ETNPPL sowohl durch PXR als auch durch LXR reguliert wird. Wie alle Typ 2 Kernrezeptoren erkennen PXR und LXR Sequenzen mit dem Konsensus „half site“ Motiv (A/G)G(G/T)TCA und binden an DR4-Typ Bindemotive (Cave et al., 2016). Die Erkennungssequenz ist im DR4-1-Motiv der R1-Region, sowie im DR4-Motiv der R2-Region zu finden. Somit bieten beide Regionen sowohl PXR als auch LXR gute potenzielle Bindestellen. Mittels Reporterassay konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der kombinierten Enhancerregionen (R1-R2) durch GW3965-Behandlung hochreguliert wurde und LXR somit ebenfalls einen Einfluss auf die Regulation des ETNPPL Gens in diesen Regionen hat.

In den verwendeten HepG2 Zellen ist bereits endogenes LXR vorhanden (Nader et al., 2012), dass durch ebenfalls vorhandene Cholesterollowerprodukte wie zum Beispiel Oxysterole aktiviert werden kann (Cave et al., 2016). Dieses aktivierte endogene LXR führt bereits ohne gezielte Transfektion von LXR und Behandlung zu einer erhöhten Aktivität, die durch gezielte Behandlung ansteigt und nach gezielter LXR-Transfektion noch höher wird. Dieser Effekt gilt für beide Isoformen LXR α und LXR β .

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ETNPPL Expression direkt durch PXR reguliert wird, in dem PXR an mehrere Motive innerhalb der zwei Enhancerregionen oberhalb der Transkriptionsstartstelle von ETNPPL bindet.

Auch LXR aktiviert ETNPPL, wie bereits von Santinha und Kollegen gezeigt wurde (Santinha et al., 2020). In dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass LXR dieselben Konstrukte aktiviert wie PXR und so zu einer Aktivierung des ETNPPL führt in dem es vermutlich an Bindestellen in diesen Regionen bindet.

5.2 Metabolische Konsequenzen der PXR-abhängigen Regulation von ETNPPL

ETNPPL katalysiert die irreversible Reaktion von Phosphoethanolamin zu Acetaldehyd, Ammoniak und Phosphat. Das Phosphoethanolamin ist ein Zwischenprodukt der PE-Synthese durch den CDP-Ethanolamin Syntheseweg. Durch die Behandlung von primären Hepatozyten mit 10 μ M Rifampicin über 48 h, wurde mittels LC-ESI-MS/MS gezeigt, dass die Konzentration von Phosphoethanolamin in den Zellen nach PXR-Aktivierung deutlich abnimmt. Da die funktionelle Relevanz der Regulation von ETNPPL durch PXR durch einen Anstieg der ETNPPL Proteinexpression gezeigt wurde, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die erhöhte Expression von ETNPPL durch PXR-Aktivierung der Grund für die reduzierte Phosphoethanolaminkonzentration ist.

Dieser Effekt könnte allerdings auch durch die PXR-abhängige Herunterregulierung von ETNK2 hervorgerufen werden (Abbildung 15C). Die funktionelle Relevanz der PXR-abhängigen Regulation von ETNK2 konnte allerdings nicht auf Proteinebene bestätigt werden. Aktuell sind nur ETNK2-Antikörper verfügbar, die noch in keiner Referenz bestätigt werden konnten und auch der *Human Protein Atlas* konnte mit dem verwendeten Antikörper keine Bande im Western Blot nachweisen. Mit den von uns bereits getesteten Antikörpern konnten keine endogenen Proteine in primären Hepatozyten und HepG2 Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Das Enzym ETNK2 katalysiert die Reaktion von Ethanolamin zu Phosphoethanolamin und damit den ersten Schritt des CDP-Ethanolamin Synthesewegs. Auch ETNK1 katalysiert diesen Schritt im CDP-Ethanolamin Syntheseweg, wird aber weder PXR- noch LXR-abhängig reguliert (Abbildung 15B). Sowohl ETNK1 als auch ETNK2 sind höchst spezifisch für Ethanolamin, werden aber in den primären Hepatozyten unterschiedlich stark exprimiert. Mit einem Ct-Wert von etwa 9,6 wird ETNK2 4-fach stärker exprimiert als ETNK1 mit Ct-Werten von etwa 11,6 (Daten nicht gezeigt). Lykidis und Kollegen zeigten mittels Northern Blot Analyse, dass

beide Ethanolaminkinasen in der Leber exprimiert werden (Lykidis et al., 2001) und das GTEX Portal bestätigt die Beobachtung, dass ETNK2 in der Leber 5,4-fach höher exprimiert ist (56,95 TPM, (Broad Institut of MIT and Harvard, 2021a)) als ETNK1 (10,51 TPM, (Broad Institut of MIT and Harvard, 2021b)).

Eine Auswirkung auf die PE-Synthese scheint der Verlust beziehungsweise die Herunterregulierung des ETNK2 auf die Zellen nicht zu haben, wie in einem Mausmodell mit ETNK2-Knockout Mäusen im Vergleich zu den wildtypischen Mäusen gezeigt werden konnte. Somit kann vermutet werden, dass die verringerte Expression des ETNK2 durch die Reaktion des ETNK1 und die der Cholininasen (CK, *CHKA* und *CHKB*) ausgeglichen wird, die ebenfalls Ethanolamin phosphorylieren können (Tian et al., 2006).

Die direkte Auswirkung der PXR-abhängigen Herunterregulierung des ETNK2 auf die Phosphoethanolamin-Synthese wurde allerdings noch nicht bestimmt.

Der Versuch auch die Konzentration an Ethanolamin und CDP-Ethanolamin während der Messung der Phosphoethanolaminkonzentration in primären humanen Hepatozyten zu bestimmen war leider nicht erfolgreich. Auf Grund eines Störpeaks kurz vor dem Ethanolaminpeak, der die Masse eines dem Ethanolamin sehr ähnlichen Metaboliten darstellen muss, wurde dieser verdeckt und konnte nicht bestimmt werden. Der Peak für das CDP-Ethanolamin war meist unterhalb der Detektionsgrenze und konnte auf Grund des fehlenden Internen Standards nicht verlässlich quantifiziert werden. Dass das CDP-Ethanolamin nicht quantifizierbar war, könnte daran liegen, dass das CDP-Ethanolamin in intakten Zellen scheinbar immer geringer vorhanden ist als das Phosphoethanolamin. Die Reaktion von Phosphoethanolamin zu CDP-Ethanolamin wird durch die ET (*PCYT2*) katalysiert, und stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des CDP-Ethanolamin Synthesewegs dar. Es wird vermutet, dass das CDP-Ethanolamin nur je nach Verfügbarkeit des benötigten Lipidankers (DAG) synthetisiert wird (Gibellini & Smith, 2010). Andererseits wäre es auch möglich, dass das CDP-Ethanolamin, als energiereiches Zwischenprodukt, direkt für die Synthese des PE durch die EPT verwendet wird und deshalb nur in geringen Konzentrationen in sowohl den mit Rifampicin- als auch den mit DMSO-behandelten Proben vorkommt.

Ob *PCYT2* PXR-abhängig herunterreguliert wird, konnte nicht festgestellt werden (p -Wert (Rifampicin, 48 h) = 0,43). Weitere Experimente mit Hepatozyten, die für 72 h oder 96 h mit Rifampicin behandelt wurden, könnten Aufschluss über den weiteren Aktivitätsverlauf geben.

Zusätzlich wäre die Bestätigung der Expression auf Proteinebene nötig, um die funktionelle Relevanz der Regulation von PCYT2 durch PXR belegen zu können.

Einen Hinweis darauf, dass PCYT2 durch PXR reguliert werden könnte, gibt die Untersuchung der PCYT2 Regulation durch LXR. Dabei wird die Expression von Pcyt2 im Mausmodell durch Oxysterole und den gemeinsamen PXR und LXR Liganden T0901317 herunterreguliert, was auch in humanen Zellen konserviert ist (Zhu & Bakovic, 2008).

Um genau sagen zu können, wie groß der Anteil der ETNPPL-Induktion bzw. der ETNK2-Reduktion an der verringerten Phosphoethanolaminkonzentration ist, wäre es sinnvoll einen siRNA-vermittelten ETNPPL Knockdown in primären humanen Hepatozyten durchzuführen und die Proben mittels LC-ESI-MS/MS zu messen. Hat ETNK2 keinen Einfluss auf die abnehmende Phosphoethanolaminkonzentration, müsste die Konzentration in den Zellen mit ETNPPL Knockdown und Rifampicinbehandlung höher, beziehungsweise nicht so stark reduziert sein, wie in den Kontrollzellen ohne ETNPPL Knockdown und Rifampicinbehandlung. Auch wäre es möglich gleichzeitig mittels Meclizin das PCYT2 zu inhibieren (Gohil et al., 2013). Zellen mit aktivem ETNPPL sollten weniger Phosphoethanolamin aufweisen, während sich bei Zellen mit ETNPPL Knockdown das Phosphoethanolamin anstaut.

Da auf dem ETNK2 Gen bereits eine Bindestelle für HNF4 α gefunden wurde (Bolotin et al., 2010) und sogar die Regulation von ETNK2 mittels siRNA-vermitteltem Doppel-Knockdown von HNF4 α und γ nachgewiesen wurde (Daigo et al., 2011) sollte die Regulation von ETNK2 auch hinsichtlich HNF4 α untersucht werden. Es ist bereits bekannt, dass PXR mit HNF4 α interagiert um Gene wie CYP3A4 oder CYP2C9 zu regulieren. Da ebenso bekannt ist, dass PXR die HNF4 α -abhängige Gentranskription inhibieren kann, wodurch es Gene herunterreguliert, sollte der Kernrezeptor HNF4 α genauer betrachtet werden (T. Li & Chiang, 2006). Die sich daraus ergebende Hypothese besagt, dass ETNK2 durch HNF4 α reguliert wird, PXR interagiert nach Rifampicin-Behandlung mit HNF4 α und führt somit zur Reduktion der ETNK2 Expression. Damit würde die PXR-abhängige Regulation von ETNK2 nur indirekt über HNF4 α erfolgen. Daher wäre eine detailliertere Betrachtung der HNF4 α -abhängigen Regulation des ETNK2 Gens ebenfalls von Interesse. Dazu wäre es empfehlenswert in primären Hepatozyten das HNF4 α per siRNA-vermitteltem Knockdown auszuschalten, oder die Zellen mit einem HNF4 α Antagonisten, zum Beispiel BI6015 (Kiselyuk et al., 2012), zu behandeln und mittels quantitativer Echtzeit-PCR die ETNK2 Expression gegen Kontrollzellen zu vergleichen, um eine HNF4 α -Abhängigkeit zu bestätigen. Anschließend könnten die Auswirkungen der HNF4 α -

abhängigen Regulation der ETNK2 Expression auf die Phosphoethanolaminkonzentration mittels LC-ESI-MS/MS untersucht werden. Dafür könnten die primären humanen Hepatozyten genauso behandelt werden, wie zuvor für die quantitative Echtzeit-PCR beschrieben.

Ebenfalls untersucht wurde das CEPT1, das den letzten Schritt im CDP-Ethanolamin Syntheseweg katalysiert: Die Reaktion von CDP-Ethanolamin zu PE. Allerdings scheint weder PXR noch LXR einen Einfluss auf die Expression dieses Enzyms zu haben.

Nach den bisherigen Ergebnissen beeinflusst PXR den CDP-Ethanolamin Syntheseweg über die Verringerung der Phosphoethanolaminmenge und könnte somit auch einen Einfluss auf die PE-Neusynthese haben.

Die Konzentration von PE und LPE nach Rifampicin-Behandlung/PXR-Aktivierung wurde nur in einem Pilotversuch mit d_4 -markiertem Ethanolamin untersucht. Da die Beschaffung von guten primären humanen Hepatozyten aus Leberresektaten von Patienten mit partieller Hepatektomie, die den Differenzierungsstatus und ihre metabolische Aktivität aufrechterhalten, problematisch ist, konnten zum aktuellen Zeitpunkt keine weiteren Experimente durchgeführt werden.

Neben der problematischen Beschaffung fordert auch die Kultivierung der erhaltenen Zellen großen Aufwand. In unserem Versuchsaufbau wurden die primären humanen Hepatozyten nur auf einen Collagen-Monolayer ausgesät und nicht zusätzlich mit Matrigel überschichtet, um mögliche Störungen der Messung per LC-ESI-MS/MS durch die Proteinmatrix zu vermeiden. Dabei könnte eine Matrigelbeschichtung der Hepatozyten während der Kultivierung die ursprüngliche Zellform und den Erhalt der Zellfunktionen unterstützen. Wie bereits Gross-Steinmeyer und Kollegen erklärten, kann eine Matrigelbeschichtung dazu führen, dass die primären Hepatozyten ihre dreidimensionale Form, sowie eine charakteristischere Zellarchitektur beibehalten. Neben dem Konfluenzgrad der Zellen auf den Zellkulturplatten, hat dies eine große Wirkung auf die Leber-spezifischen Funktionen und die Erhaltung der Differenzierungscharakteristika und damit eventuell auch auf eine bessere Erhaltung der *in vivo* Situation (Gross-Steinmeyer et al., 2005).

In unserem Pilotversuch deutet die Messung der deuterierten PEs/LPEs daraufhin, dass es nach PXR-Aktivierung durch Rifampicin zu einer Reduktion der PE-Neusynthese kommen kann. Das Ergebnis muss in weiteren Experimenten reproduziert werden, um die Reduktion der PE/LPE-Neusynthese durch Rifampicin-Behandlung bestätigen zu können. Eine zusätzliche Matrigelbeschichtung würde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unterstützen und führt,

wie die Proteinanalyse gezeigt hat (Abbildung 8), zu einer konsistenteren und tendenziell höheren Basalexpressionen des ETNPPL Proteins. Wie in einem Pilotversuch gezeigt werden konnte, hat die Matrigelbeschichtung keine Auswirkungen auf die Messung der Proben mit dem LC-ESI-MS/MS (Daten nicht gezeigt).

Sollten die Experimentwiederholungen die Reduktion der PE/LPE-Neusynthese bestätigen, liegt die Vermutung nahe, dass eine PXR-Aktivierung durch die erhöhte Expression von ETNPPL und die dadurch verringerte Konzentration an Phosphoethanolamin Einfluss auf das PC/PE-Verhältnis der Zellen nehmen könnte.

Sowohl ein zu hohes als auch ein zu niedriges PC/PE-Verhältnis kann den Energiemetabolismus vieler Organellen negativ beeinflussen. Daher versucht die Zelle immer, das Verhältnis von PC zu PE im Gleichgewicht zu halten. Zu hohe Konzentrationen an PC werden durch den MDR3-Transporter in die Galle sekretiert und biliär ausgeschieden oder direkt zu DAG umgewandelt, während zu hohe PE Konzentrationen für die PC-Synthese über die PEMT verwendet oder zu PS über die PSS2 umgewandelt werden können (van der Veen et al., 2017).

Ein reduziertes PC/PE-Verhältnis würde das Membranpotential verringern und somit Entzündungsreaktionen auslösen (Z. Li et al., 2006), während ein erhöhtes PC/PE-Verhältnis, vor allem in Mitochondrien, das Überleben der Zelle und das Zellwachstum negativ beeinflussen und die Sauerstoffaufnahme und die ATP-Konzentration reduzieren würde (van der Veen et al., 2017).

Eine direkte Veränderung in diesem Verhältnis konnte während dieser Arbeit nicht untersucht werden. Weitere Experimente mit primären Hepatozyten, behandelt mit deuteriertem Ethanolamin und Cholin wären notwendig, um eine Konzentrationsänderung in den Zellen festzustellen.

Santina und Kollegen konnten in primären humanen Hepatozyten eine um 12% verringerte PE-Konzentration nach ETNPPL Induktion durch GW3965 messen, dies hatte allerdings keinen direkten Einfluss auf das PC/PE-Verhältnis, was auch am Versuchsaufbau gelegen haben könnte. Eine Verringerung der PE-Konzentration um nur 12% könnte von der Zelle durch, zum Beispiel, Decarboxylierung des PS um PE zu erhalten ausgeglichen werden. Alternativ wäre es auch möglich, dass eine längere Inkubationszeit (größer 48 h) nötig gewesen wäre oder dass der Mangel an PE durch die vorhandenen Phospholipide im Medium ausgeglichen wurde (Santina et al., 2020).

Eine verringerte PE-Konzentration hätte ebenfalls eine negative Auswirkung auf die Autophagie, da das PE an der Autophagosombildung beteiligt ist. Die Autophagie wird vermutlich in Tumorzellen dazu verwendet, um unnötige Makromoleküle zu degradieren, um bestimmte Bausteine für die erhöhte Proliferation der Tumorzelle wiederzugewinnen (Deng et al., 2020). Da das ETNPPL zum Beispiel im hepatozellulärem Karzinom (HCC) herunterreguliert ist, kommt es zu einem Überschuss an Phosphoethanolamin und somit zu einer erhöhten PE-Neusynthese, was für die Bereitstellung von Phospholipiden während der Tumorgenese eine wichtige Rolle spielt. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass ein ETNPPL Knockdown zu einer erhöhten *de novo* Lipogenese und einer Anhäufung von Lipidtröpfchen führt, was die Neubildung von Membranen während dem Tumorzellwachstum unterstützt (Ding et al., 2016).

Deng und Kollegen vermuten daher, dass das ETNPPL als potenzieller Tumorsuppressor einen vielversprechenden Biomarker für die Diagnostik und Prognostik von Tumoren darstellt (Deng et al., 2020).

Ob die PXR-Aktivierung und die damit verbundene erhöhte ETNPPL Expression tatsächlich Einfluss auf die PE-Konzentration und somit auf das PC/PE-Verhältnis hat, muss, wie bereits erwähnt, in weiteren Experimenten verifiziert werden.

Welche Auswirkungen ein erhöhtes PC/PE-Verhältnis auf die Zellen hätte, müsste ebenfalls noch detaillierter untersucht werden. Die meisten Publikationen beschreiben ein reduziertes PC/PE-Verhältnis, dass durch den Verlust der Membranintegrität zu Entzündungsreaktionen führt und somit in der Leber mit NAFLD in Verbindung gebracht wird (Arendt et al., 2013).

Auf der anderen Seite entsteht Phosphoethanolamin nicht nur aus Ethanolamin, sondern wird ebenfalls als Nebenprodukt des Sphingolipid-Synthesewegs aus Sphingosin 1-Phosphat synthetisiert (Hla & Dannenberg, 2012). Der Sphingolipid-Syntheseweg wird auch durch PXR beeinflusst. Eine PXR-Aktivierung führt zur Störung der Regulation der Untereinheit SPTLC3 der Serin-Palmitoyltransferase (SPT), des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms, durch HNF4 α (O. Burk, persönliche Mitteilung, 09.06.2021).

Ob dieser Syntheseweg Einfluss auf die Synthese von PE hat, ist unklar. Vermutlich kann das hier synthetisierte Phosphoethanolamin ebenfalls in den CDP-Ethanolamin Syntheseweg einfließen und somit für die PE-Synthese zur Verfügung stehen aber auch durch ETNPPL in Acetaldehyd und Ammoniak umgewandelt werden.

Ethanolamin kann neben der direkten Aufnahme über die Nahrung auch aus Anandamid, über die Fettsäure-Amid Hydrolase (FAAH) (Matas et al., 2007), oder aus PE (wieder)gewonnen werden. Ein weiterer Syntheseweg für Ethanolamin ist wohl die Basenaustauschreaktion mit PS, in der die Ethanolamin-Kopfgruppe des PE gegen ein Serin ausgetauscht wird. Allerdings kann auch über die Phospholipase D (PLD) aus PE Ethanolamin und Sphingosin 1-Phosphat hydrolysiert werden (Kiss et al., 1997).

Wie Patel und Kollegen zusammenfassten, hat insbesondere Ethanolamin schützende Eigenschaften. Allgemein gilt es als Wachstumsfaktor, da es für die PE-Synthese verwendet wird. Außerdem hat es wohl eine kardioprotektive Rolle in dem es STAT-3 aktiviert und es schützt die Zellen vor Apoptose, ausgelöst durch Behandlung mit niedriger Serumkonzentration, nach Degradierung des Anandamid durch FAAH (Patel & Witt, 2017).

Auch das Phosphoethanolamin ist als kleine Aminosäure an metabolischen Synthesewegen verschiedener Lipide beteiligt. Dazu gehört, neben dem Kennedy-Pathway, dass es als Nebenprodukt aus dem Sphingosin, Endocannabinoid (z. B. Anandamid) und Plasmalogen Abbau entsteht und als potenzieller Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette gilt (White et al., 2021). Neben dem Phosphoethanolamin inhibiert auch Ethanolamin die mitochondriale Elektronentransferaktivität und die oxidative Phosphorylierung *in vitro*, wodurch beide Einfluss auf die mitochondriale Atmungskette nehmen (Modica-Napolitano & Renshaw, 2004; Gohil et al., 2013) und dadurch die Apoptose fördern können.

Somit wäre es auch denkbar, dass die Hochregulierung der ETNPPL Expression durch PXR-Aktivierung einen protektiven Effekt hat, in dem eine Anhäufung von insbesondere Phosphoethanolamin und damit eine Schädigung der Mitochondrien verhindert wird. White und Kollegen zeigten bereits, dass ETNPPL für die Regulation der Phosphoethanolaminkonzentration im Gehirn von Mäusen verantwortlich ist (White et al., 2021).

Dass es wichtig ist, die Konzentration des Phosphoethanolamin zu regulieren, wurde in Fruchtfliegen bereits für das Nervensystem gezeigt. Ebenfalls ist bekannt, dass ETNPPL eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Lipidhomöostase im Gehirn spielt. In Leberproben von Mäusen scheint ein Verlust des ETNPPL keinen Einfluss auf die totale Phospholipidmenge zu haben. Dafür beeinflusst ETNPPL die Konzentration bestimmter PE- und PC-Spezies. Daraus lässt sich schließen, dass ETNPPL vermutlich an der Regulierung der Phospholipid-Acyl-Ketten-Homöostase beteiligt ist (White et al., 2021).

Auch eine erhöhte Konzentration an Anandamid (ein Endocannabinoid) zum Beispiel, kann sich negativ auf die Zelle auswirken, in dem die Aktivierung des Cannabinoid-Rezeptor 1 (CB1) durch Anandamid, zu einer erhöhten *de novo* Fettsäuresynthese führt, was die Entstehung von NAFLD fördern könnte. Durch Bisphenol A-Behandlung kommt es neben der Ansammlung von Triglyceriden auch zu erhöhten Anandamidspiegeln in der humanen Hepatozyten-Zelllinie HHL-5 (Martella et al., 2016). Wie bereits bekannt ist, führt eine Bisphenol A-Behandlung zu einer Aktivierung des PXR (Sui et al., 2012; Takeshita et al., 2001).

Somit würde durch den Einfluss von Bisphenol A PXR aktiviert und dadurch die Expression von ETNPPL hochreguliert. Das aus Anandamid entstandene Ethanolamin könnte direkt zu Phosphoethanolamin umgewandelt werden, was über das hochregulierte ETNPPL sofort zu Acetaldehyd, Ammoniak und Phosphat umgebaut wird. Somit würde die Zelle vor zu hohen Anandamidspiegeln, die zu NAFLD oder sogar Zelltod führen könnten (Siegmond et al., 2006), und zu hohen Phosphoethanolaminkonzentrationen, die die Zelle vergiften würden, geschützt. Eine Untersuchung, ob PXR Einfluss auf die Aktivität der FAAH nimmt, wäre an dieser Stelle von Interesse, um die Bedeutung des Anandamid auf die Synthese von Phosphoethanolamin einschätzen zu können.

Somit gibt es mehrere Möglichkeiten, wie PXR Einfluss auf den CDP-Ethanolamin Syntheseweg nehmen kann, die noch nicht genauer untersucht wurden. Diese Hypothesen sind in Abbildung 24 grafisch durch gestrichelte Linien dargestellt.

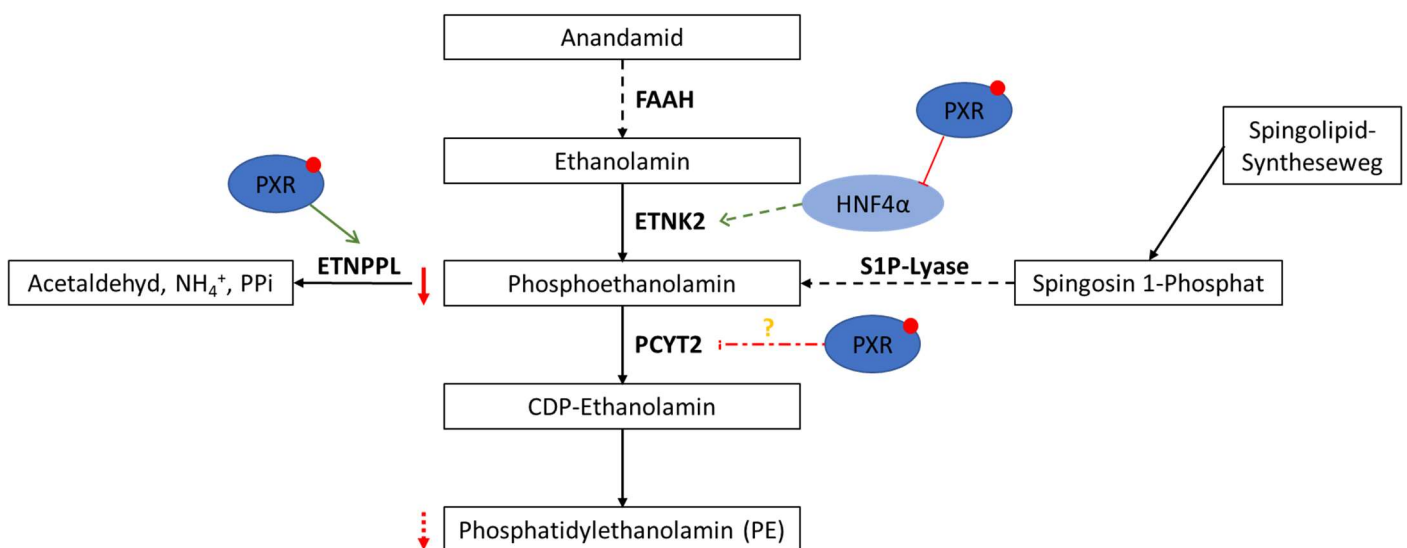


Abbildung 24: Schema des CDP-Ethanolamin Synthesewegs und des hypothetischen Einflusses der PXR-Aktivierung auf die PE-Synthese.

Durch PXR-Aktivierung (der rote Punkt stellt einen PXR-Liganden dar, zum Beispiel Rifampicin) wird die ETNPPL Expression erhöht und somit vermehrt Phosphoethanolamin zu Acetaldehyd, Ammoniak und Phosphat abgebaut. Außerdem wird die ETNK2 Expression durch PXR-Aktivierung herunterreguliert, was Einfluss auf die Phosphoethanolamin Synthese aus Ethanolamin haben kann. Da eine Regulation von ETNK2 durch HNF4 α bereits vermutet wird, könnte die PXR-abhängige Regulation indirekt über HNF4 α Inhibition durch PXR funktionieren. Diese Regulation muss in weiteren Untersuchungen detaillierter geklärt werden.

Ebenfalls muss in weiteren Experimenten überprüft werden, ob PCYT2 durch PXR herunterreguliert wird.

Allein durch die Induktion der ETNPPL und der vermutlichen Inhibition der ETNK2 Expression scheint die PXR-Aktivierung zu einer Abnahme der Phosphoethanolaminmenge zu führen, wodurch vermutlich die PE-Synthese reduziert wird. Eine verringerte PE-Konzentration könnte auf das PC/PE-Verhältnis Einfluss nehmen. Alternativ könnte die erhöhte ETNPPL Expression nach PXR-Aktivierung auch einen protektiven Effekt haben, in dem hohe Konzentrationen an Phosphoethanolamin sofort umgebaut werden und diese somit die Zelle nicht mehr vergiften können. Phosphoethanolamin entsteht nicht nur aus Ethanolamin, sondern ist ebenfalls ein Nebenprodukt der Sphingosin 1-Phosphat Lyase (S1P-Lyase) des Sphingosin-Synthesewegs. Ethanolamin wird entweder über die Nahrung aufgenommen oder aus der Hydrolyse des Anandamid über die Fettsäure-Amid Hydrolyse (FAAH) gewonnen und könnte anschließend für die Synthese des Phosphoethanolamin verwendet werden. Hypothetische Effekte sind als gestrichelte Linien und eindeutig nachgewiesene Schritte als durchgezogene Linien dargestellt.

Es wurde gezeigt, dass die PXR-abhängige Hochregulierung der ETNPPL Expression in primären Hepatozyten zu einer Reduktion der Phosphoethanolaminkonzentration und dadurch vermutlich auch zu einer geringeren Neusynthese diverser PE- und LPE-Spezies führt. Das könnte einen Einfluss auf das PC/PE-Verhältnis und somit auf den Zellmembranaufbau oder einen protektiven Effekt haben, in dem die erhöhte ETNPPL Expression die Zelle vor hohen Phosphoethanolaminkonzentrationen schützt.

Um bestimmen zu können, ob eine PXR Aktivierung Einfluss auf das PC/PE-Verhältnis hat oder eher einen protektiven Effekt, müsste die Messung der PE- und LPE-Spezies wiederholt und ebenfalls mit den PC- und LPC-Spezies durchgeführt werden. Sollte die PXR Aktivierung auch

die Konzentration der PC- und LPC-Spezies reduzieren, hat diese keinen Einfluss auf das PC/PE-Verhältnis.

5.3 Die Regulation von SEC14L4 in Leberzellen

Auch die Genexpression von SEC14L4 wird PXR-abhängig hochreguliert, ist aber, im Gegensatz zur ETNPPL Expression, LXR unabhängig.

Die *in silico* Untersuchung der Sequenz von -15 kb bis +9,6 kb beginnend vom Start des ersten Exons des SEC14L4 Gens ergab 10 Regionen mit potenziellen PXR-Bindestellen, von denen sich 6 Regionen 3' unterhalb des ersten Exons (SE1-SE6, siehe Abbildung 20) und 4 Regionen 5' oberhalb des ersten Exons (S1-S4, siehe Abbildung 23) befinden. Von den gefundenen Regionen konnten durch Reporterassays mit PXR und RXR α Kotransfektion gesichert zwei der Regionen (SE5 und S4) als PXR-abhängige Enhancerregionen festgestellt werden.

Für die Enhancerregion SE5 weist das ER6-DR4-Motiv die stärkste Interaktion mit dem PXR/RXR α -Heterodimer auf, dabei überlappt das ER6-Motiv das DR4-Motiv vollständig. Außerdem ist in dieser Region eine RXR α -Bindestelle vorhanden, die möglicherweise mit dem separaten DR4-Motiv überlappt aber keine gute Erkennungssequenz ((A/G)G(G/T)TCA) aufweist. Die ENCODE-Daten weisen auf eine Chromatinbindung des RXR α hin. Das kann sowohl auf die Bindung eines RXR α -Heterodimers als auch die Bindung eines RXR α -Homodimers hindeuten und lässt somit keinen eindeutigen Schluss zu, ob die vorhandene RXR α -Bindestelle Auswirkungen auf die PXR-Bindung an das DR4-Motiv hat. Mittels EMSA wurde nur eine Bindung des PXR/RXR α -Heterodimers an das separate DR4-Motiv festgestellt. Dabei muss aber die Schwäche des EMSA beachtet werden, dass diese nur die *in vitro* Situation widerspiegelt.

Das DR6-Motiv der SE5-Region zeigt die schwächste Interaktion mit PXR/RXR α und wird vermutlich wenig Einfluss auf die Regulation des SEC14L4 durch PXR-Aktivierung haben. Um die Bedeutung der einzelnen Bindemotive der SE5-Region festzustellen, wäre als nächstes eine Mutationsanalyse der einzelnen Bindemotive erforderlich.

Außerdem wäre eine Untersuchung der oberhalb des ersten Exons liegenden S4-Region mittels EMSA von Interesse, um die potenziellen PXR-Bindemotive genauer zu betrachten.

Anschließend wäre eine Mutationsanalyse erforderlich, um die Bedeutung der einzelnen Motive der SE5- und S4-Region zu ermitteln.

Eine Untersuchung der PXR-abhängigen Regulation des SEC14L4 Gens ist wegen seines vermuteten Einflusses auf den CDP-Cholin Syntheseweg von Interesse. Dieser Syntheseweg läuft parallel zum CDP-Ethanolamin Syntheseweg und dient der PC-Synthese. Die genaue Funktion und die Auswirkungen auf den CDP-Cholin Syntheseweg wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Allerdings kann vermutet werden, dass das SEC14L4, wie bereits für das SEC14p der Hefe gezeigt wurde, an PC gebunden die Enzymaktivität von PCYT1 inhibiert und somit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dieses Synthesewegs beeinflusst (Howe & McMaster, 2006; Mousley et al., 2007).

Von PCYT1 gibt es zwei Isoformen, PCYT1 α und PCYT1 β , mit je zwei Spleißvarianten, kodiert durch die Gene *PCYT1A* und *PCYT1B*. *PCYT1B* wird in den meisten Geweben deutlich geringer exprimiert als *PCYT1A* (Gibellini & Smith, 2010). Untersuchung von *PCYT1A* ergab, dass dieses Gen nicht durch PXR oder LXR reguliert wird und die Ct-Werte der quantitativen Echtzeit-PCR für *PCYT1B* waren unterhalb der Quantifizierungsgrenze (> 20 Ct, Daten nicht gezeigt), was auf eine sehr geringe Expression hindeutet.

Weitere Gene des CDP-Cholin Synthesewegs könnten in zukünftigen Experimenten untersucht werden. Zwar hat die Transkriptomanalyse von Kandel und Kollegen keinen Hinweis darauf geliefert, dass PXR Einfluss auf weitere Gene des CDP-Cholin Synthesewegs hat, aber eine quantitative Echtzeit-PCR Analyse könnte gesichertere Ergebnisse dazu liefern (Kandel et al., 2016).

Eine Inhibierung des PCYT1 durch SEC14L4 könnte eine reduzierte PC-Konzentration zur Folge haben. Allein gesehen, könnte eine erhöhte SEC14L4 Expression durch PXR-Aktivierung zu einem verringerten PC/PE-Verhältnis führen, was mit der Entstehung von NAFLD assoziiert ist (Z. Li et al., 2006). Da aber auf der anderen Seite durch PXR-Aktivierung vermutlich die PE-Konzentration ebenfalls verringert ist, könnte diese Regulation des CDP-Cholin Synthesewegs auch einen protektiven Effekt für das PC/PE-Verhältnis der Zelle haben.

Allerdings muss für das SEC14L4 erst einmal gezeigt werden, dass es einen Einfluss auf die PC-Konzentration hat. Dazu wäre ein siRNA-vermittelter Knockdown von SEC14L4 in primären humanen Hepatozyten mit anschließender Bestimmung der PC-Spezies nach Behandlung mit Rifampicin oder DMSO im LC-ESI-MS/MS sinnvoll.

Interessant wäre auch die Untersuchung der PEMT, da das Enzym die Reaktion von PE zu PC katalysiert und somit auch zur Erhaltung des PC/PE-Verhältnisses beiträgt. Hierzu sollte die PXR-abhängigkeit des Gens mittels quantitativer Echtzeit-PCR untersucht werden.

Die Untersuchung von SEC14L4 ist noch unvollständig. Da das Gen aber potenziell Einfluss auf den Kennedy Pathway haben kann, sollte es in Zukunft genauer betrachtet werden, um den Einfluss von PXR im Phospholipid Metabolismus beurteilen zu können.

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass SEC14L4 PXR-abhängig durch Rifampicin-Behandlung induziert aber nicht durch LXR reguliert wird.

Außerdem wurden potenzielle Enhancerregionen gefunden, die mittels Mutationsanalyse verifiziert werden sollten.

Da die genaue Funktion von SEC14L4, zum Beispiel im CDP-Cholin Syntheseweg, unbekannt ist, wäre eine metabonomische Analyse von SEC14L4 Knockdown in Hepatozyten im Vergleich zur Kontrolle nötig und könnte wichtige Hinweise liefern, an welchen Synthesewegen oder Regulationen SEC14L4 beteiligt ist.

Der direkte Einfluss von PXR auf die Gene des CDP-Cholin Synthesewegs könnte in weiteren Experimenten definiert werden. Hier wäre auch eine Analyse der PEMT und der Synthasen PSS1 und PSS2 auf eine mögliche Regulation durch PXR interessant, um einen direkten Einfluss auf diese Enzyme bestimmen zu können.

Interessante Aufschlüsse in Bezug auf die Auswirkung der PXR-Aktivierung auf den gesamten Kennedy-Pathway, und die potenzielle Funktion des SEC14L4, könnte eine detailliertere Metabolitanalyse des CDP-Cholin Synthesewegs, sowie ein direkter Vergleich der PE- und PC-Neusynthese liefern. Dazu wäre eine Markierung des Cholin, wie auch schon des Ethanolamin, notwendig.

Da das PS ebenfalls eine Rolle in der PE-Neusynthese spielt und über die Synthasen PSS1 und PSS2 aus sowohl PC als auch PE synthetisiert werden kann, wäre eine Markierung des Serin ebenfalls interessant um einen möglichen Einfluss des PS auf die Erhaltung des PC/PE-Verhältnisses zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

- Arendt, B. M., Ma, D. W. L., Simons, B., Noureldin, S. A., Therapondos, G., Guindi, M., Sherman, M., & Allard, J. P. (2013). Nonalcoholic fatty liver disease is associated with lower hepatic and erythrocyte ratios of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, *38*(3), 334–340. <https://doi.org/10.1139/apnm-2012-0261>
- Bankaitis, V. A., Malehorn, D. E., Emr, S. D., & Greene, R. (1989). The *Saccharomyces cerevisiae* SEC14 gene encodes a cytosolic factor that is required for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. *Journal of Cell Biology*, *108*(4), 1271–1281. <https://doi.org/10.1083/jcb.108.4.1271>
- Bitter, A., Rümmele, P., Klein, K., Kandel, B. A., Rieger, J. K., Nüssler, A. K., Zanger, U. M., Trauner, M., Schwab, M., & Burk, O. (2015). Pregnane X receptor activation and silencing promote steatosis of human hepatic cells by distinct lipogenic mechanisms. *Archives of Toxicology*, *89*(11), 2089–2103. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1348-x>
- Bolotin, E., Liao, H., Ta, T. C., Yang, C., Hwang-Verslues, W., Evans, J. R., Jiang, T., & Sladek, F. M. (2010). Integrated approach for the identification of human hepatocyte nuclear factor 4 α target genes using protein binding microarrays. *Hepatology*, *51*(2), 642–653. <https://doi.org/10.1002/hep.23357>
- Broad Institut of MIT and Harvard. (2021a, Juni 30). *GTEX Portal*. <https://www.gtexportal.org/home/gene/ETNK2>
- Broad Institut of MIT and Harvard. (2021b, Juni 30). *GTEX Portal ETNK1*. <https://www.gtexportal.org/home/gene/ETNK1>
- Buchman, C. D., Chai, S. C., & Chen, T. (2018). A current structural perspective on PXR and CAR in drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *14*(6), 635–647. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1476488>

- Calzada, E., Onguka, O., & Claypool, S. M. (2016). Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Bd. 321, S. 29–88). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.10.001>
- Cave, M. C., Clair, H. B., Hardesty, J. E., Falkner, K. C., Feng, W., Clark, B. J., Sidey, J., Shi, H., Aqel, B. A., McClain, C. J., & Prough, R. A. (2016). Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(9), 1083–1099. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.03.002>
- Curwin, A. J., Fairn, G. D., & McMaster, C. R. (2009). Phospholipid Transfer Protein Sec14 Is Required for Trafficking from Endosomes and Regulates Distinct trans-Golgi Export Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 284(11), 7364–7375. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808732200>
- Daigo, K., Kawamura, T., Ohta, Y., Ohashi, R., Katayose, S., Tanaka, T., Aburatani, H., Naito, M., Kodama, T., Ihara, S., & Hamakubo, T. (2011). Proteomic Analysis of Native Hepatocyte Nuclear Factor-4 α (HNF4 α) Isoforms, Phosphorylation Status, and Interactive Cofactors. *Journal of Biological Chemistry*, 286(1), 674–686. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.154732>
- Darvey, I. G. (1998). Is free ethanolamine required as a catalyst for the de novo biosynthesis of phosphatidylethanolamine and ethanolamine in mammals? *Biochemical Education*, 26(1), 24–26. [https://doi.org/10.1016/S0307-4412\(98\)80001-0](https://doi.org/10.1016/S0307-4412(98)80001-0)
- Deng, Y., Wu, L., Ding, Q., & Yu, H. (2020). AGXT2L1 is downregulated in carcinomas of the digestive system. *Oncology Letters*, 20(2), 1318–1326. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11645>
- Ding, Q., Kang, J., Dai, J., Tang, M., Wang, Q., Zhang, H., Guo, W., Sun, R., & Yu, H. (2016). AGXT2L1 is down-regulated in hepatocellular carcinoma and associated with abnormal lipogenesis. *Journal of Clinical Pathology*, 69(3), 215–220. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-203042>
- Fleishood, H. L., & Pitot, H. C. (1970). The metabolism of O-phosphorylethanolamine in animal tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 141(2), 423–429. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(70\)90158-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(70)90158-X)

- Frank, C., Makkonen, H., Dunlop, T. W., Matilainen, M., Väisänen, S., & Carlberg, C. (2005). Identification of Pregnane X Receptor Binding Sites in the Regulatory Regions of Genes Involved in Bile Acid Homeostasis. *Journal of Molecular Biology*, *346*(2), 505–519. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.12.003>
- Fukuda, H., Katsurada, A., & Iritani, N. (1992). Effects of nutrients and hormones on gene expression of ATP citrate-lyase in rat liver. *European Journal of Biochemistry*, *209*(1), 217–222. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17279.x>
- Fullerton, M. D., & Bakovic, M. (2010). Complementation of the metabolic defect in CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (Pcyt2)–deficient primary hepatocytes. *Metabolism*, *59*(12), 1691–1700. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2010.03.022>
- Geick, A., Eichelbaum, M., & Burk, O. (2001). Nuclear Receptor Response Elements Mediate Induction of Intestinal MDR1 by Rifampin. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(18), 14581–14587. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010173200>
- Gibellini, F., & Smith, T. K. (2010). The Kennedy pathway-De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/iub.337>
- Gohil, V. M., Zhu, L., Baker, C. D., Cracan, V., Yaseen, A., Jain, M., Clish, C. B., Brookes, P. S., Bakovic, M., & Mootha, V. K. (2013). Meclizine Inhibits Mitochondrial Respiration through Direct Targeting of Cytosolic Phosphoethanolamine Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(49), 35387–35395. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.489237>
- Gross-Steinmeyer, K., Stapleton, P. L., Tracy, J. H., Bammler, T. K., Lehman, T., Strom, S. C., & Eaton, D. L. (2005). Influence of Matrigel-overlay on constitutive and inducible expression of nine genes encoding drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes. *Xenobiotica*, *35*(5), 419–438. <https://doi.org/10.1080/00498250500137427>

- Habermehl, D., Kempna, P., Azzi, A., & Zingg, J.-M. (2004). Recombinant SEC14-like proteins (TAP) possess GTPase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 326(1), 254–259. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.021>
- Hakkola, J., Rysä, J., & Hukkanen, J. (2016). Regulation of hepatic energy metabolism by the nuclear receptor PXR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(9), 1072–1082. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2016.03.012>
- Hla, T., & Dannenberg, A. J. (2012). Sphingolipid Signaling in Metabolic Disorders. *Cell Metabolism*, 16(4), 420–434. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.017>
- Howe, A. G., & McMaster, C. R. (2006). Regulation of phosphatidylcholine homeostasis by Sec14This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled Young Investigator's Forum. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 84(1), 29–38. <https://doi.org/10.1139/Y05-138>
- Ihunnah, C. A., Jiang, M., & Xie, W. (2011). Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1812(8), 956–963. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.01.014>
- Ivanisevic, J., Zhu, Z.-J., Plate, L., Tautenhahn, R., Chen, S., O'Brien, P. J., Johnson, C. H., Marletta, M. A., Patti, G. J., & Siuzdak, G. (2013). Toward 'Omic Scale Metabolite Profiling: A Dual Separation–Mass Spectrometry Approach for Coverage of Lipid and Central Carbon Metabolism. *Analytical Chemistry*, 85(14), 6876–6884. <https://doi.org/10.1021/ac401140h>
- Jeske, J., Bitter, A., Thasler, W. E., Weiss, T. S., Schwab, M., & Burk, O. (2017). Ligand-dependent and -independent regulation of human hepatic sphingomyelin phosphodiesterase acid-like 3A expression by pregnane X receptor and crosstalk with liver X receptor. *Biochemical Pharmacology*, 136, 122–135. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.04.013>
- Kandel, B. A., Thomas, M., Winter, S., Damm, G., Seehofer, D., Burk, O., Schwab, M., & Zanger, U. M. (2016). Genomewide comparison of the inducible transcriptomes of nuclear receptors CAR,

- PXR and PPAR α in primary human hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(9), 1218–1227. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.03.007>
- Kempna, P., Ricciarelli, R., Azzi, A., & Zingg, J.-M. (2010). Alternative splicing and gene polymorphism of the human TAP3/SEC14L4 gene. *Molecular Biology Reports*, 37(7), 3503–3508. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9943-2>
- Kempná, P., Zingg, J.-M., Ricciarelli, R., Hierl, M., Saxena, S., & Azzi, A. (2003). Cloning of novel human SEC14p-like proteins: Ligand binding and functional properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(11), 1458–1472. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00173-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00173-4)
- Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., & Haussler, D. (2002a). *The human genome browser at UCSC - ETNPPL/AGXT2L1*. https://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr22%3A30884143%2D30901894&hgside=1131460735_eyDUk14Tx5OuAO3t83L84ZAyzyj0
- Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., & Haussler, D. (2002b). *The human genome browser at UCSC - SEC14L4*. https://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr4%3A109663202%2D109684235&hgside=1131460735_eyDUk14Tx5OuAO3t83L84ZAyzyj0
- Kiselyuk, A., Lee, S.-H., Farber-Katz, S., Zhang, M., Athavankar, S., Cohen, T., Pinkerton, A. B., Ye, M., Bushway, P., Richardson, A. D., Hostetler, H. A., Rodriguez-Lee, M., Huang, L., Spangler, B., Smith, L., Higginbotham, J., Cashman, J., Freeze, H., Itkin-Ansari, P., ... Levine, F. (2012). HNF4 α Antagonists Discovered by a High-Throughput Screen for Modulators of the Human Insulin Promoter. *Chemistry & Biology*, 19(7), 806–818. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.05.014>

- Kiss, Z., Crilly, S. K., & Anderson, H. W. (1997). Extracellular sphingosine 1-phosphate stimulates formation of ethanolamine from phosphatidylethanolamine: Modulation of sphingosine 1-phosphate-induced mitogenesis by ethanolamine. *Biochemical Journal*, *328*(2), 383–391. <https://doi.org/10.1042/bj3280383>
- Knowles, B., Howe, C., & Aden, D. (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*, *209*(4455), 497–499. <https://doi.org/10.1126/science.6248960>
- Li, L., Li, H., Garzel, B., Yang, H., Sueyoshi, T., Li, Q., Shu, Y., Zhang, J., Hu, B., Heyward, S., Moeller, T., Xie, W., Negishi, M., & Wang, H. (2015). SLC13A5 Is a Novel Transcriptional Target of the Pregnane X Receptor and Sensitizes Drug-Induced Steatosis in Human Liver. *Molecular Pharmacology*, *87*(4), 674–682. <https://doi.org/10.1124/mol.114.097287>
- Li, T., & Chiang, J. Y. L. (2006). Rifampicin induction of CYP3A4 requires pregnan X receptor cross talk with hepatocyte nuclear factor 4 α and coactivators, and suppression of small heterodimer partner gene expression. *Drug Metabolism and Disposition*, *34*(5), 756–764. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.007575>
- Li, Z., Agellon, L. B., Allen, T. M., Umeda, M., Jewell, L., Mason, A., & Vance, D. E. (2006). The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metabolism*, *3*(5), 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.03.007>
- Li, Z. Z., Berk, M., McIntyre, T. M., & Feldstein, A. E. (2009). Hepatic Lipid Partitioning and Liver Damage in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(9), 5637–5644. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807616200>
- Lieber, C. S. (1988). Metabolic effects of acetaldehyde. *Biochemical Society Transactions*, *16*(3), 241–247. <https://doi.org/10.1042/bst0160241>
- Lykidis, A., Wang, J., Karim, M. A., & Jackowski, S. (2001). Overexpression of a Mammalian Ethanolamine-specific Kinase Accelerates the CDP-ethanolamine Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(3), 2174–2179. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008794200>

- M. Podvinec; University of Basel. (2021, Juni 30). *NUBIScan: Main page*. NubiScan V2.0.
<https://www.nubiscan.unibas.ch/>
- Ma, J., Yan, R., Zu, X., Cheng, J.-M., Rao, K., Liao, D.-F., & Cao, D. (2008). Aldo-keto Reductase Family 1 B10 Affects Fatty Acid Synthesis by Regulating the Stability of Acetyl-CoA Carboxylase- α in Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(6), 3418–3423.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M707650200>
- Mackowiak, B., & Wang, H. (2016). Mechanisms of xenobiotic receptor activation: Direct vs. indirect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, *1859*(9), 1130–1140.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.02.006>
- Martella, A., Silvestri, C., Maradonna, F., Gioacchini, G., Allarà, M., Radaelli, G., Overby, D. R., Di Marzo, V., & Carnevali, O. (2016). Bisphenol A Induces Fatty Liver by an Endocannabinoid-Mediated Positive Feedback Loop. *Endocrinology*, *157*(5), 1751–1763.
<https://doi.org/10.1210/en.2015-1384>
- Martens, S., Nakamura, S., & Yoshimori, T. (2016). Phospholipids in Autophagosome Formation and Fusion. *Journal of Molecular Biology*, *428*(24), 4819–4827.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.10.029>
- Matas, D., Juknat, A., Pietr, M., Klin, Y., & Vogel, Z. (2007). Anandamide Protects from Low Serum-induced Apoptosis via Its Degradation to Ethanolamine. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(11), 7885–7892. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608646200>
- Mathäs, M., Christian Nußhag, Burk, O., Gödtel-Armbrust, U., Herlyn, H., Wojnowski, L., & Windshügel, B. (2014). Structural and Functional Similarity of Amphibian Constitutive Androstane Receptor with Mammalian Pregnane X Receptor. *PLoS ONE*, *9*(5), e96263.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096263>
- McMaster, C. R., & Bell, R. M. (1997). CDP-ethanolamine:1,2-diacylglycerol ethanolaminephosphotransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, *1348*(1–2), 117–123. [https://doi.org/10.1016/S0005-2760\(97\)00098-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2760(97)00098-2)

- Modica-Napolitano, J. S., & Renshaw, P. F. (2004). Ethanolamine and phosphoethanolamine inhibit mitochondrial function in vitro: Implications for mitochondrial dysfunction hypothesis in depression and bipolar disorder. *Biological Psychiatry*, *55*(3), 273–277.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(03\)00784-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(03)00784-4)
- Moreau, A., T rueel, C., Beylot, M., Albalea, V., Tamasi, V., Umbdenstock, T., Parmentier, Y., Sa-Cunha, A., Suc, B., Fabre, J.-M., Navarro, F., Ramos, J., Meyer, U., Maurel, P., Vilarem, M.-J., & Pascussi, J.-M. (2009). A novel pregnane X receptor and S14-mediated lipogenic pathway in human hepatocyte. *Hepatology*, *49*(6), 2068–2079. <https://doi.org/10.1002/hep.22907>
- Mousley, C. J., Tyeryar, K. R., Vincent-Pope, P., & Bankaitis, V. A. (2007). The Sec14-superfamily and the regulatory interface between phospholipid metabolism and membrane trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1771*(6), 727–736.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.04.002>
- Nader, N., Ng, S. S. M., Wang, Y., Abel, B. S., Chrousos, G. P., & Kino, T. (2012). Liver X Receptors Regulate the Transcriptional Activity of the Glucocorticoid Receptor: Implications for the Carbohydrate Metabolism. *PLoS ONE*, *7*(3), e26751.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026751>
- Nelson, C. C., Faris, J. S., Hendy, S. C., & Romaniuk, P. J. (1993). Functional analysis of the amino acids in the DNA recognition alpha-helix of the human thyroid hormone receptor. *Molecular Endocrinology*, *7*(9), 1185–1195. <https://doi.org/10.1210/mend.7.9.8247021>
- Oladimeji, P., Cui, H., Zhang, C., & Chen, T. (2016). Regulation of PXR and CAR by protein-protein interaction and signaling crosstalk. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *12*(9), 997–1010. <https://doi.org/10.1080/17425255.2016.1201069>
- Patel, D., & Witt, S. N. (2017). Ethanolamine and Phosphatidylethanolamine: Partners in Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 1–18.
<https://doi.org/10.1155/2017/4829180>

- Pavlovic, Z., & Bakovic, M. (2013). Regulation of Phosphatidylethanolamine Homeostasis—The Critical Role of CTP:Phosphoethanolamine Cytidylyltransferase (Pcyt2). *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(2), 2529–2550. <https://doi.org/10.3390/ijms14022529>
- Pawlak, M., Lefebvre, P., & Staels, B. (2012). General Molecular Biology and Architecture of Nuclear Receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *12*(6), 486–504. <https://doi.org/10.2174/156802612799436641>
- Piedade, R., Traub, S., Bitter, A., Nüssler, A. K., Gil, J. P., Schwab, M., & Burk, O. (2015). Carboxymefloquine, the Major Metabolite of the Antimalarial Drug Mefloquine, Induces Drug-Metabolizing Enzyme and Transporter Expression by Activation of Pregnane X Receptor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(1), 96–104. <https://doi.org/10.1128/AAC.04140-14>
- Robinson-Rechavi, M., Garcia, H. E., & Laudet, V. (2003). The nuclear receptor superfamily. *Journal of Cell Science*, *116*(4), 585–586. <https://doi.org/10.1242/jcs.00247>
- Rockenfeller, P., Koska, M., Pietrocola, F., Minois, N., Knittelfelder, O., Sica, V., Franz, J., Carmona-Gutierrez, D., Kroemer, G., & Madeo, F. (2015). Phosphatidylethanolamine positively regulates autophagy and longevity. *Cell Death & Differentiation*, *22*(3), 499–508. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.219>
- Saito, K., Tautz, L., & Mustelin, T. (2007). The lipid-binding SEC14 domain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1771*(6), 719–726. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.02.010>
- Santinha, D., Klopot, A., Marques, I., Ellis, E., Jorns, C., Johansson, H., Melo, T., Antonson, P., Jakobsson, T., Félix, V., Gustafsson, J.-Å., Domingues, M. R., Mode, A., & Helguero, L. A. (2020). Lipidomic analysis of human primary hepatocytes following LXR activation with GW3965 identifies AGXT2L1 as a main target associated to changes in phosphatidylethanolamine. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *198*, 105558. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105558>

- Schiroli, D., Cirrincione, S., Donini, S., & Peracchi, A. (2013). Strict reaction and substrate specificity of AGXT2L1, the human O-phosphoethanolamine phospho-lyase: Strict Specificity of the Human O-Phosphoethanolamine Phospho-Lyase. *IUBMB Life*, *65*(7), 645–650.
<https://doi.org/10.1002/iub.1178>
- Siegmund, S. V., Seki, E., Osawa, Y., Uchinami, H., Cravatt, B. F., & Schwabe, R. F. (2006). Fatty Acid Amide Hydrolase Determines Anandamide-induced Cell Death in the Liver. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(15), 10431–10438. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509706200>
- Singh, R. K., Fullerton, M. D., Vine, D., & Bakovic, M. (2012). Mechanism of hypertriglyceridemia in CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase-deficient mice. *Journal of Lipid Research*, *53*(9), 1811–1822. <https://doi.org/10.1194/jlr.M021881>
- Smit-McBride, Z., & Privalsky, M. L. (1994). DNA sequence specificity of the v-erb A oncoprotein/thyroid hormone receptor: Role of the P-box and its interaction with more N-terminal determinants of DNA recognition. *Molecular Endocrinology*, *8*(7), 819–828.
<https://doi.org/10.1210/mend.8.7.7984144>
- Sui, Y., Ai, N., Park, S.-H., Rios-Pilier, J., Perkins, J. T., Welsh, W. J., & Zhou, C. (2012). Bisphenol A and Its Analogues Activate Human Pregnane X Receptor. *Environmental Health Perspectives*, *120*(3), 399–405. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104426>
- Sundqvist, A., Bengoechea-Alonso, M. T., Ye, X., Lukiyanchuk, V., Jin, J., Harper, J. W., & Ericsson, J. (2005). Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCFFbw7. *Cell Metabolism*, *1*(6), 379–391.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.04.010>
- Szanto, A., Narkar, V., Shen, Q., Uray, I. P., Davies, P. J. A., & Nagy, L. (2004). Retinoid X receptors: Exploring their (patho)physiological functions. *Cell Death & Differentiation*, *11*(S2), S126–S143.
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401533>
- Takeshita, A., Koibuchi, N., Oka, J., Taguchi, M., Shishiba, Y., & Ozawa, Y. (2001). Bisphenol-A, an environmental estrogen, activates the human orphan nuclear receptor, steroid and

- xenobiotic receptor-mediated transcription. *European Journal of Endocrinology*, 513–517.
<https://doi.org/10.1530/eje.0.1450513>
- Thasler, W. E., Weiss, T. S., Schillhorn, K., Stoll, P.-T., Irrgang, B., & Jauch, K.-W. (2003). Charitable state-controlled foundation Human tissue and Cell Research: Ethic and legal aspects in the supply of surgically removed human tissue for research in the academic and commercial sector in Germany. *Cell and Tissue Banking*, 4(1), 49–56.
<https://doi.org/10.1023/A:1026392429112>
- The Metabolomics Innovation Center (TMIC). (2021, Februar 22). *Human Metabolome Database: Showing metabocard for Ethanolamine (HMDB0000149)*. Human Metabolome Database (HMDB). <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000149>
- Tian, Y., Jackson, P., Gunter, C., Wang, J., Rock, C. O., & Jackowski, S. (2006). Placental Thrombosis and Spontaneous Fetal Death in Mice Deficient in Ethanolamine Kinase 2. *Journal of Biological Chemistry*, 281(38), 28438–28449. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605861200>
- van der Veen, J. N., Kennelly, J. P., Wan, S., Vance, J. E., Vance, D. E., & Jacobs, R. L. (2017). The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1859(9), 1558–1572.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.006>
- Vance, J. E. (2008). Thematic Review Series: Glycerolipids. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. *Journal of Lipid Research*, 49(7), 1377–1387.
<https://doi.org/10.1194/jlr.R700020-JLR200>
- Vettraino, C., Peracchi, A., Donini, S., & Parisini, E. (2020). Structural characterization of human O-phosphoethanolamine phospho-lyase. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 76(4), 160–167. <https://doi.org/10.1107/S2053230X20002988>

- Wang, C., Rajput, S., Watabe, K., Liao, D.-F., & Cao, D. (2010). Acetyl-CoA carboxylase- α as a novel target for cancer therapy. *Frontiers in Bioscience*, *S2(2)*, 515–526.
<https://doi.org/10.2741/s82>
- Wang, H., & LeCluyse, E. L. (2003). Role of Orphan Nuclear Receptors in the Regulation of Drug-Metabolising Enzymes: *Clinical Pharmacokinetics*, *42(15)*, 1331–1357.
<https://doi.org/10.2165/00003088-200342150-00003>
- White, C. J., Ellis, J. M., & Wolfgang, M. J. (2021). The role of ethanolamine phosphate phospholyase in regulation of astrocyte lipid homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, *297(1)*, 100830.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100830>
- Zhao, H., Matsuzaka, T., Nakano, Y., Motomura, K., Tang, N., Yokoo, T., Okajima, Y., Han, S., Takeuchi, Y., Aita, Y., Iwasaki, H., Yatoh, S., Suzuki, H., Sekiya, M., Yahagi, N., Nakagawa, Y., Sone, H., Yamada, N., & Shimano, H. (2017). Elovl6 Deficiency Improves Glycemic Control in Diabetic *db / db* Mice by Expanding β -Cell Mass and Increasing Insulin Secretory Capacity. *Diabetes*, *66(7)*, 1833–1846. <https://doi.org/10.2337/db16-1277>
- Zhu, L., & Bakovic, M. (2008). Liver X Receptor Agonists Inhibit the Phospholipid Regulatory Gene CTP: Phosphoethanolamine Cytidylyltransferase-Pcyt2. *Research Letters in Biochemistry*, *2008*, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2008/801849>
- Zhu, L., Johnson, C., & Bakovic, M. (2008). Stimulation of the human CTP:phosphoethanolamine cytidylyltransferase gene by early growth response protein 1. *Journal of Lipid Research*, *49(10)*, 2197–2211. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800259-JLR200>
- Zingg, J.-M., Kempna, P., Paris, M., Reiter, E., Villacorta, L., Cipollone, R., Munteanu, A., De Pascale, C., Menini, S., Cuffe, A., Arock, M., Azzi, A., & Ricciarelli, R. (2008). Characterization of three human sec14p-like proteins: α -Tocopherol transport activity and expression pattern in tissues. *Biochimie*, *90(11–12)*, 1703–1715. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.07.008>

Erklärung über gemeinschaftliche Arbeiten

Die Durchführung der Messung am Triple Quadrupol LC-MS-MS-System mit JetStream Electrospray-Quelle und Ion Funnel (LC-ESI-MS/MS) erfolgte in Kooperation mit der AG Analytik des Dr. Margarethe Fischer-Bosch Instituts für klinische Pharmakologie in Stuttgart. Das Aufarbeitungsprotokoll wurde aus der Publikation von Ivanisevic und Kollegen ausgearbeitet (Ivanisevic et al., 2013). Alle Geräteeinstellungen und die Messüberwachung, sowie ein Teil der Auswertung wurden von Monika Seiler durchgeführt. Die finale Auswertung der gemessenen MS-Peaks und die daraus erfolgte Kalkulation der Konzentrationen wurde von Dr. Ute Hofmann übernommen.

Danksagung

Zuerst bedanke ich mich bei Dr. Oliver Burk für seine hervorragende Betreuung und Unterstützung. Es war eine sehr lehrreiche Zeit, die dank der vielen wissenschaftlichen Diskussionen und des offenen Austauschs meine Arbeit vorangebracht hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Matthias Schwab möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für klinische Pharmakologie in Stuttgart durchführen zu können.

Ebenfalls gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Peter Ruth für die Begutachtung meiner Doktorarbeit vonseiten der Universität Tübingen.

Mein besonderer Dank gilt Karina Abuazi Rincones für ihre Unterstützung im Labor.

Für die Hilfe bei der Untersuchung der Metabolite des Kennedy Pathways mittels LC-ESI-MS/MS möchte ich mich bei Dr. Ute Hofmann und Monika Seiler bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Enni-Kaisa Mustonen für ihre Hilfsbereitschaft im Laboralltag, sowie bei Denise Wilhelm, Annika Maas, Anika Fuhr, Kerstin Winter und Tina Oberacker für ihre tägliche Unterstützung im Büroalltag und die schöne Zeit, die wir gemeinsam im IKP verbracht haben.

Ein besonderer Dank gilt meiner Mutter Karin Schäfers und ihrem Lebensgefährten Alexander Schön, meinem Vater Andreas Schäfers und seiner Lebensgefährtin Martina Hudelmeier, sowie meinem Mann Tobias Löffler für die liebevolle Unterstützung und den steten Rückhalt.