

Untersuchungen zur Expression des Cytochrom P450 3A4
und zur Expression und transkriptionellen Regulation
des Pregnan-X-Rezeptors im Menschen



DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2004

vorgelegt von

Renzo Wolbold

Tag der mündlichen Prüfung	18. März 2004
Dekan	Prof. Dr. H. Probst
1. Berichterstatter	Prof. Dr. Michel Eichelbaum
2. Berichterstatter	Prof. Dr. Michael Schwarz

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGEN	8
ZUSAMMENFASSUNG	9
1 EINLEITUNG	12
1.1 FREMDSTOFFMETABOLISMUS.....	12
1.1.1 <i>Polymorphismen und Induktion von Proteinen des Biotransformationssystems</i>	13
1.1.2 <i>Cytochrom P450 3A4</i>	13
1.2 KERNREZEPTOREN	15
1.2.1 <i>Allgemeines</i>	15
1.2.2 <i>Funktion von Kernrezeptoren</i>	17
1.2.2.1 <i>Prinzip der DNA-Erkennung und -Bindung von Kernrezeptoren</i>	17
1.2.2.2 <i>Prinzip der Ligandenbindung von Kernrezeptoren</i>	19
1.2.2.3 <i>Molekulare Mechanismen der transkriptionellen Regulation durch Kernrezeptoren</i>	20
1.3 DER PREGNAN-X-REZEPTOR	21
1.3.1 <i>Allgemeines</i>	21
1.3.2 <i>Liganden des Pregnan-X-Rezeptors</i>	22
1.3.3 <i>Struktur und Aufbau der Ligandenbindungsdomäne von PXR</i>	24
1.3.4 <i>DNA Bindungseigenschaften von PXR</i>	25
1.3.5 <i>Rolle von PXR als Xenobiotikasensor und Gallensäurensensor</i>	25
1.3.6 <i>Rolle von PXR bei der Entstehung von unerwünschten Arzneimittelinteraktionen</i>	26
1.3.7 <i>Polymorphismen im menschlichen PXR Gen</i>	27
1.3.8 <i>PXR knock out- und transgene Mäuse</i>	27
1.4 HEPATOCYTE NUCLEAR FACTOR 4 α	28
1.5 ZIELSETZUNG.....	30
2 MATERIAL UND METHODEN	31
2.1 MATERIAL.....	31
2.1.1 <i>Geräte</i>	31
2.1.2 <i>Kits und Verbrauchsmaterialien</i>	31
2.1.2.1 <i>Kits</i>	31
2.1.2.2 <i>Verbrauchsmaterial</i>	32
2.1.3 <i>Software</i>	33
2.1.3.1 <i>Lokale Softwareapplikationen</i>	33
2.1.3.2 <i>Online-Datenbanken und -Applikationen</i>	33
2.1.4 <i>Puffer und Lösungen</i>	34

2.1.4.1	Allgemeine Puffer und Lösungen.....	34
2.1.4.2	Puffer und Lösungen für DNA- und RNA-Analytik	34
2.1.4.3	Puffer und Lösungen für Proteinanalytik.....	35
2.1.4.3.1	Puffer und Lösungen für Aufarbeitung von Lebergewebe.....	35
2.1.4.3.2	Puffer und Lösungen für Western Blotting.....	35
2.1.4.4	Puffer und Lösungen für PolyA ⁺ RNA Isolierung.....	36
2.1.4.4.1	Stammlösungen	36
2.1.4.4.2	Gebrauchslösungen.....	36
2.1.4.5	Puffer und Lösungen für CTAB Plasmidisolierung.....	36
2.1.4.6	Puffer und Lösungen für Primer Extension	37
2.1.4.7	Puffer und Lösungen für Reporterassays	37
2.1.4.8	Puffer für Electrophoretic Mobility Shift Assays	37
2.1.4.9	Medien für Kultur von <i>Escherichia coli</i>	38
2.1.4.10	Medien für Kultur von Säugerzellen	38
2.1.5	<i>Antikörper und rekombinante Proteine</i>	38
2.1.6	<i>Plasmide</i>	39
2.1.7	<i>Gewebeproben aus klinischen Studien</i>	40
2.1.7.1	Gewebe aus der Lebergewebebankstudie IKP148.....	40
2.1.7.2	Gewebe aus der Leber- und Darmgewebesammelstudie IKP113	40
2.1.7.3	Gewebe aus der Rifampicin-Digoxin-Interaktionsstudie IKP112	41
2.2	METHODEN	41
2.2.1	<i>Allgemeine DNA Methoden</i>	41
2.2.1.1	Dephosphorylierung von Plasmiden mit Shrimp Alkalischer Phosphatase	41
2.2.1.2	Transformation von TOP10F ['] <i>E. coli</i>	41
2.2.1.3	Selektion und Vermehrung von Transformanten und Rekombinanten.....	42
2.2.1.4	Isolierung von Plasmid DNA aus Mini-Kulturen	42
2.2.1.5	Isolierung von Plasmid DNA für Transfektionsexperimente.....	42
2.2.1.6	Aufreinigung von DNA Fragmenten	43
2.2.1.6.1	Agarosegelelektrophorese	43
2.2.1.6.2	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	43
2.2.1.7	Nucleinsäuresequenzierung mit der Didesoxynucleotidmethode	44
2.2.2	<i>PolyA⁺ RNA Isolierung</i>	45
2.2.2.1	Ernte der Zellen.....	45
2.2.2.2	Lyse der Zellen.....	45
2.2.2.3	Aufbereitung und Nachbereitung der Oligo(dT)-Cellulose	45
2.2.2.4	Chromatographie	45
2.2.2.5	RNA-Präzipitation.....	46
2.2.3	<i>Primer Extension</i>	46
2.2.3.1	Radioaktive Markierung und Aufreinigung der Oligonucleotidprimer.....	46
2.2.3.2	Hybridisierung und Primer Extension	46
2.2.3.3	Gelelektrophorese und Detektion	47
2.2.4	<i>RNA Ligase-mediated Rapid Amplification of cDNA Ends</i>	47
2.2.4.1	Dephosphorylierung der RNA.....	47
2.2.4.2	Präzipitation der RNA	47
2.2.4.3	Entfernung der CAP-Struktur.....	48

2.2.4.4	Ligation des RNA Oligonucleotids mit der modifizierten mRNA.....	48
2.2.4.5	Reverse Transkription.....	48
2.2.4.6	Polymerase Chain Reaction.....	48
2.2.4.7	TOPO TA Klonierung und Sequenzierung.....	49
2.2.5	<i>Quantitative Reverse Transkription-Polymerase Chain Reaction</i>	49
2.2.5.1	Isolierung von Gesamt-RNA.....	49
2.2.5.2	cDNA Synthese.....	50
2.2.5.3	<i>Real-time Polymerase Chain Reaction</i>	51
2.2.6	<i>Proteinanalytik</i>	53
2.2.6.1	Präparation der mikrosomalen Fraktion aus humanem Lebergewebe.....	53
2.2.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	54
2.2.6.3	Polyacrylamidgelelektrophorese.....	54
2.2.6.4	Semi Dry Blotting.....	55
2.2.6.5	Immunchemische Detektion.....	55
2.2.7	<i>Generierung einer Reportergenplasmidbibliothek mit unidirektional deletierten PXR-Promotorfragmenten</i>	56
2.2.7.1	Generierung des parentalen PXR-Promotor-Reportergenkonstrukts.....	56
2.2.7.2	Unidirektionale Deletion der 5' flankierenden Region durch restriktionsendonucleolytischen Verdau.....	56
2.2.7.2.1	Restriktionsverdau des parentalen Kontruktes pGL3-PXR(-2543).....	57
2.2.7.2.2	Auffüllen der überhängenden Termini mit dem Klenow Fragment.....	57
2.2.7.2.3	Trimmen der überhängenden Termini mit der T4 DNA Polymerase.....	57
2.2.7.2.4	Religation.....	58
2.2.7.3	Unidirektionale Deletion der 5'-flankierenden Region durch Verdau mit Exonuclease III.....	58
2.2.8	<i>Ortsgerichtete Mutagenese</i>	59
2.2.8.1	Mutagenesereaktion.....	59
2.2.8.2	Subklonierung des mutierten Inserts.....	59
2.2.9	<i>Generierung und Klonierung von multimerisierten HNF4α- und GRα Bindungselementen</i>	60
2.2.9.1	Phosphorylierung der Oligonucleotide.....	61
2.2.9.2	Aufreinigung durch Phenol-Chloroform-Extraktion.....	62
2.2.9.3	Hybridisierung und Multimerisierung.....	62
2.2.9.4	Selektion korrekter Ligationsprodukte.....	62
2.2.9.5	Klonierung vor den Thymidinkinaseminimalpromotor.....	63
2.2.10	<i>Zellkulturmethoden</i>	64
2.2.10.1	Subkultivierung von Zellen.....	64
2.2.10.2	Zellzahlbestimmung.....	64
2.2.10.3	Kryokonservierung von Zellen.....	64
2.2.10.4	Auftauen von kryokonservierten Zellen.....	64
2.2.11	<i>Transiente Transfektion von Säugerzellen</i>	65
2.2.11.1	Vorbereitung der Zellen zur Transfektion.....	65
2.2.11.2	Transiente Transfektion mit Effectene™ Reagens.....	65
2.2.11.3	Behandlung der transfizierten Zellen mit Induktoren.....	65
2.2.11.4	Behandlung von foetalem Kälberserum mit dextranbeschichteter Aktivkohle.....	66
2.2.11.4.1	Bereitung der Dextran-Aktivkohle.....	66
2.2.11.4.2	Behandlung des Serums.....	66
2.2.11.5	Reportergenassays.....	66

2.2.11.5.1	Präparation der Zellextrakte	66
2.2.11.5.2	Messung der Luciferase- und β -Galactosidaseaktivität	67
2.2.12	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>	67
2.2.12.1	Radioaktive Markierung des Oligonucleotids	67
2.2.12.1.1	Hybridisierung der Einzelstrang-Oligonucleotide	67
2.2.12.1.2	Radioaktive Markierung	68
2.2.12.1.3	Abtrennung nicht inkorporierter Radioaktivität.....	68
2.2.12.2	<i>In vitro</i> Transkription und Translation von DNA-bindenden Faktoren	68
2.2.12.3	Präparation von Kernextrakten aus kultivierten Zelllinien	69
2.2.12.4	Proteinbestimmung der Kernextrakte	69
2.2.12.5	Polyacrylamidgelelektrophorese und Detektion	69
3	ERGEBNISSE.....	71
3.1	EXPRESSION VON CYTOCHROM P450 3A4 UND DEM PREGNAN-X-REZEPTOR	71
3.1.1	<i>Expression von Cytochrom P450 3A4 und dem Pregnan-X-Rezeptor in der Leber.....</i>	<i>71</i>
3.1.1.1	Cytochrom P450 3A4 Proteinexpression in der Leber	71
3.1.1.2	Cytochrom P450 3A4 mRNA Expression in der Leber.....	74
3.1.1.3	Pregnan-X-Rezeptor mRNA Expression in der Leber.....	74
3.1.1.4	Zusammenhang zwischen Cytochrom P450 3A4 Protein, mRNA und PXR mRNA Expression und geschlechtsspezifische Unterschiede der Expression.....	74
3.1.2	<i>Expression von Cytochrom P450 3A4 und dem Pregnan-X-Rezeptor im Darm.....</i>	<i>78</i>
3.2	EINFLUSS VON RIFAMPICIN AUF DIE EXPRESSION VON CYTOCHROM P450 3A4, MDR1 UND DES PREGNAN-X-REZEPTORS IM DARM	78
3.3	CHARAKTERISIERUNG DER 5' FLANKIERENDEN REGION DES PXR GENS	82
3.3.1	<i>Bestimmung der Transkriptionsstartstelle des PXR Gens.....</i>	<i>82</i>
3.3.1.1	<i>Primer Extension.....</i>	<i>82</i>
3.3.1.2	<i>RNA Ligase-mediated Rapid Amplification of 5' cDNA ends-PCR.....</i>	<i>83</i>
3.3.2	<i>Subklonierung der 5' flankierenden Region des PXR Gens.....</i>	<i>85</i>
3.3.3	<i>Generierung einer Bibliothek von Promotor-Reportergen-Konstrukten mit unidirektional verkürzten Promotorfragmenten des PXR Gens</i>	<i>85</i>
3.3.4	<i>Basale Aktivität der PXR-Promotor-Reportergen-Konstrukte.....</i>	<i>87</i>
3.3.4.1	Basale Aktivität der Reportergenkonstrukte in LS174T Zellen.....	88
3.3.4.2	Basale Aktivität der Reportergenkonstrukte in HepG2 Zellen	91
3.3.4.3	Basale Aktivität der Reportergenkonstrukte in COS-1 Zellen.....	91
3.3.4.4	Basale Aktivität der Reportergenkonstrukte in HeLa Zellen.....	91
3.3.5	<i>Aktivität der PXR-Promotor-Reportergen-Konstrukte bei Co-Transfektion von HNF4α1.....</i>	<i>92</i>
3.3.5.1	Aktivität der Reportergenkonstrukte bei Co-Transfektion von HNF4 α 1 in LS174T Zellen	93
3.3.5.2	Aktivität der Reportergenkonstrukte bei Co-Transfektion von HNF4 α 1 in HepG2 Zellen.....	93
3.3.5.3	Aktivität der Reportergenkonstrukte bei Co-Transfektion von HNF4 α 1 in COS-1 Zellen	96
3.3.5.4	Aktivität der Reportergenkonstrukte bei Co-Transfektion von HNF4 α 1 in HeLa Zellen	96
3.3.6	<i>Aktivität von PXR-Promotor-Reportergen-Konstrukten mit mutierten DR1 Motiven.....</i>	<i>97</i>
3.3.6.1	Basale Aktivität von Reportergenkonstrukten mit mutierten DR1 Motiven.....	99
3.3.6.2	Aktivität von Reportergenkonstrukten mit mutierten DR1 Motiven bei Co-Transfektion mit HNF4 α 1	99
3.3.7	<i>Interaktion von HNF4α mit dem HNF4α-RE im Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>	<i>102</i>

3.3.7.1	Interaktion von <i>in vitro</i> synthetisiertem HNF4 α 1 mit dem HNF4 α -RE.....	102
3.3.7.2	Interaktion von HNF4 α aus Kernextrakten mit dem HNF4 α -RE.....	104
3.3.8	<i>Einfluss des HNF4α-RE auf die Aktivität des Thymidinkinase minimalpromotors</i>	106
3.3.8.1	Einfluss des HNF4 α -RE auf die Promotoraktivität in COS-1 Zellen.....	106
3.3.8.2	Einfluss des HNF4 α -RE auf die Promotoraktivität in LS174T Zellen.....	107
3.3.9	<i>Aktivität von PXR-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten bei Co-Transfektion von COUP-TFI und COUP-TFII</i>	108
3.3.10	<i>Interaktion von COUP-TFI und COUP-TFII mit dem HNF4α-RE im Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>	110
3.3.11	<i>Aktivität von PXR-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten bei Co-Transfektion von PXR und Behandlung mit Rifampicin</i>	112
3.3.12	<i>Aktivität von PXR-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten bei Co-Transfektion von GRα und Behandlung mit Dexamethason</i>	112
4	DISKUSSION	116
4.1	EXPRESSIONSANALYSE DES CYTOCHROM P450 3A4 UND DES PREGNAN-X-REZEPTORS.....	116
4.1.1	<i>Geschlechtsabhängig dimorphe Expression des Cytochrom P450 3A4</i>	116
4.1.1.1	Mögliche Ursachen und potentielle Beteiligung von HNF4 α an der geschlechtsdimorphen Expression von CYP3A4.....	119
4.1.2	<i>Variabilität der Expression des Pregnan-X-Rezeptors und Korrelation zwischen PXR und CYP3A4 Expression</i>	121
4.2	CHARAKTERISIERUNG DES PXR-PROMOTORS.....	124
4.2.1	<i>Identifikation von cis-acting Elementen und transkriptionell relevanten Sequenzbereichen</i>	124
4.2.2	<i>Transkriptionelle Regulation des PXR-Promotors durch trans-acting Faktoren</i>	125
4.2.2.1	Hepatocyte Nuclear Factor 4 α	125
4.2.2.2	<i>Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factors</i>	128
4.2.2.3	Glucocorticoidrezeptor.....	130
4.2.2.4	Autoregulation des Pregnan-X-Rezeptors.....	130
4.2.2.5	<i>CCAAT Enhancer Binding Protein β</i>	131
4.3	BEDEUTUNG VON HNF4 α FÜR DIE BIOTRANSFORMATION.....	133
5	LITERATURVERZEICHNIS	134
	ANHANG	149
	DANKSAGUNG	153
	LISTE DER AKADEMISCHEN LEHRER	154
	LEBENS LAUF	155

ABKÜRZUNGEN

AF	<i>Activation Function</i> , Aktivierungsfunktion
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> , Rinderserumalbumin
CAR	<i>Constitutive Androstane Receptor</i>
COUP-TF	<i>Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CYP3A4	Cytochrom P450 3A4
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR	<i>Direct Repeat</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Foetales Kälberserum
GR	Glucocorticoidrezeptor
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HNF	<i>Hepatocyte Nuclear Factor</i>
LBD	Ligandenbindungsdomäne
MDR	<i>Multidrug Resistance</i>
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
NR	<i>Nuclear Receptor</i> ; Kernrezeptor
P450	Cytochrom P450
PCN	Pregnenolon-16 α -carbonitril
P-gp	P-Glykoprotein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PXR	Pregnan-X-Rezeptor
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
RE	<i>Response Element</i>
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SDS	<i>Sodium Dodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TAMRA	6-Carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamin
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

ZUSAMMENFASSUNG

Um der Exposition gegenüber Pharmaka, anderen Xenobiotika und potentiell schädigenden Metaboliten endogener und exogener Herkunft zu begegnen, besitzen viele Organismen ein Biotransformationssystem, durch welches diese Verbindungen durch chemische Modifikation oftmals unschädlich und ausscheidbar gemacht und schließlich aus dem Organismus eliminiert werden. Ein wichtiger Bestandteil des Biotransformationssystems sind die Cytochrom P450 Monooxygenasen, die in der Phase I der Biotransformation durch Oxidations-, Reduktions- und Hydrolysereaktionen eine für den weiteren Verlauf der Biotransformation wichtige Funktionalisierung ihrer Substrate bewirken. Eine der wichtigsten Monooxygenasen ist das Cytochrom P450 3A4 (CYP3A4), welches mengenmäßig das bedeutendste P450 Isoenzym in der Leber des Menschen darstellt und welches an der Verstoffwechslung von mehr als 50% aller gegenwärtig in der Therapie eingesetzten Wirkstoffe beteiligt ist. Die Genexpression und enzymatische Aktivität von CYP3A4 ist von beträchtlicher interindividueller Variabilität. Eine individuelle Regulation der Genexpression, bedingt durch Induktionsprozesse und genetische Polymorphismen, wird als mögliche Ursache untersucht, wobei der Einfluss letzterer eher gering zu sein scheint. Die Induktion von CYP3A4 und einer Reihe anderer wichtiger Proteine der Biotransformation durch bestimmte Induktoren wird unter anderem durch den Pregnan-X-Rezeptor (PXR), ein Mitglied der Superfamilie der Kernrezeptoren, vermittelt. Diese sind zumeist ligandenaktivierbare Transkriptionsfaktoren, die mit regulatorischen DNA Bereichen von Genen und mit anderen Proteinen, Kernrezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Co-Aktivatoren und – Repressoren und Bestandteilen der zellulären Transkriptionsmaschinerie interagieren und so die Transkription ihrer Zielgene regulieren und modulieren. Obwohl PXR als ein zentraler *upstream regulator* der Biotransformation an der transkriptionellen Kontrolle mehrerer xenobiotika-metabolisierender Enzyme und Transporterproteine beteiligt ist, war über Mechanismen der Regulation des menschlichen PXR Gens selbst bisher nichts bekannt. Es lagen jedoch Hinweise vor, dass die Expression des PXR Gens durch den *Hepatocyte Nuclear Factor 4 α* (HNF4 α), den Glucocorticoidrezeptor (GR) und durch PXR selbst reguliert wird.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Expression des Cytochrom P450 3A4 und des Pregnan-X-Rezeptors in der Leber und im Darm des Menschen untersucht werden und ein möglicher Zusammenhang zwischen beiden Parametern überprüft werden. Weiterhin sollte der Einfluss der individuellen PXR Expression auf die Induzierbarkeit des intestinalen CYP3A4 und P-Glykoprotein (P-gp) durch den PXR-Agonisten Rifampicin untersucht werden. Schließlich sollte die 5' flankierende Region des PXR Gens im Rahmen einer Promotoranalyse charakterisiert werden, um *cis-acting* Elemente, die für die transkriptionelle Regulation von Bedeutung sind, und Kernrezeptoren und Transkriptionsfaktoren, die als *trans-acting* Faktoren an der Regulation beteiligt sind, zu identifizieren.

Bei der Expressionsanalyse von CYP3A4 in menschlicher Leber anhand einer Gewebekbank von 94 Patientenproben konnte die bereits bekannte, erhebliche interindividuelle Variabilität sowohl auf der Protein- als auch auf der mRNA-Ebene bestätigt werden. Außerdem wurde ein Geschlechtsdimorphismus bei der Expression von CYP3A4 gefunden. In Leberproben von Frauen war die durchschnittliche CYP3A4 Protein- und mRNA Expression jeweils signifikant höher als in Proben von Männern. Ein solcher Dimorphismus war bereits für die durch CYP3A4 katalysierte Bildung einiger Metabolite bekannt, ein geschlechtsspezifischer Expressionsunterschied war jedoch bis jetzt noch nicht nachgewiesen worden. Auch die Expression des Pregnan-X-Rezeptors war von beträchtlicher Variabilität, sie schwankte in der Leber um einen Faktor von mehr als 17 und war mit der Expression der CYP3A4 mRNA sowohl in der Leber als auch im Darm korreliert. Bei der Untersuchung der intestinalen Induzierbarkeit von CYP3A4 und MDR1 durch Rifampicin anhand von Duodenalbiopsien wurde eine Ko-Induktion der beiden PXR Zielgene CYP3A4 und MDR1 gefunden, die individuelle PXR Expression war jedoch nicht ausschlaggebend für das Induktionsausmaß.

Für die Charakterisierung der 5'-flankierenden Region des PXR Gens wurde zunächst die Transkriptionsstartstelle identifiziert. Dabei wurden unterschiedliche Haupttranskriptionsstartstellen in der Leber und im Darm des Menschen gefunden. Zur Untersuchung der 5'-flankierenden Region wurde eine Plasmidbibliothek von Reportergenkonstrukten mit unidirektionalen Verkürzungen des von Position -2543 bis +195 relativ zum Transkriptionsstart in der Leber subklonierten PXR-Promotors generiert. Durch transiente Transfektionsexperimente mit dieser Plasmidbibliothek und ortsgerechte Mutagenese der 5'-flankierenden Region wurde ein Kernrezeptor *response element* (RE) vom DR1 Typ identifiziert, das für die Aktivität des PXR Promotors in den etablierten Zelllinien LS174T und HepG2 von essentieller bzw. erheblicher Bedeutung ist. In *in vitro* DNA Bindungsexperimenten wurde gezeigt, dass HNF4 α spezifisch an dieses RE bindet. Das identifizierte HNF4 α -RE war für die Responsivität des PXR-Promotors gegenüber exogenem HNF4 α 1 verantwortlich und war in der Lage, eine Responsivität gegenüber HNF4 α 1 auf einen heterologen Promotor zu vermitteln. Die Kernrezeptoren COUP-TFI und COUP-TFII, die als hemmend wirksame Faktoren auch als funktionelle Antagonisten zu HNF4 α wirken können, inhibierten die Aktivität des PXR-Promotors in Abhängigkeit vom Vorhandensein des funktionellen HNF4 α -RE ohne jedoch direkt an dieses zu binden, d.h. vermutlich durch eine *trans*-Repression. Für eine Beteiligung des Glucocorticoidrezeptors oder des Pregnan-X-Rezeptors selbst an der Regulation der Transkription von PXR wurden dagegen keine Belege gefunden.

Der im Rahmen dieser Arbeit beschriebene Geschlechtsdimorphismus bei der Expression eines der wichtigsten Cytochrom P450 Enzyme stellt eine Erklärungsmöglichkeit für beobachtete geschlechtsspezifische Unterschiede beim Metabolismus bestimmter Pharmaka dar und könnte bei der Entwicklung und Evaluation von Pharmaka, die Substrate von CYP3A4 sind, beachtenswert sein. Durch die Charakterisierung der Promotorregion des für die Biotransformation zentralen Kernrezeptors Pregnan-X-Rezeptor und die Identifizierung von Faktoren, die an seiner

transkriptionellen Regulation beteiligt sind, wurde ein Beitrag zur Aufklärung der komplexen regulatorischen Netzwerke und Signaltransduktionswege des Biotransformationssystems geleistet, welcher zu einem besseren Verständnis dieses für die Pharmakaentwicklung und -anwendung kritischen Systems führt. Mit der generierten Plasmidbibliothek von Promotor-Reportergen-Konstrukten der 5'-flankierenden Region des PXR Gens steht außerdem ein Werkzeug zur Verfügung, mit dem durch die Identifikation weiterer für die Regulation der PXR Transkription relevanter Faktoren das Verständnis des komplexen Regulationsgeschehens erweitert werden kann.

1 EINLEITUNG

1.1 Fremdstoffmetabolismus

Organismen sind durch die Aufnahme von Nahrung und allgemein durch die Exposition gegenüber ihrer Umwelt ständig mit körperfremden chemischen Verbindungen konfrontiert. Um potentiell schädliche oder unerwünschte Wirkungen dieser als Xenobiotika bezeichneten Verbindungen oder von deren Stoffwechselprodukten zu vermeiden oder abzumildern, aber auch um körpereigene, endogene Verbindungen abbauen und entsorgen zu können, besitzen beinahe alle Organismen ein sogenanntes Biotransformationssystem. Dieses besteht aus einer Vielzahl von verschiedenen Proteinen, die in Geweben entsprechend ihrer zu erfüllenden Aufgabe und der chemischen Charakteristik der von ihnen metabolisierten oder transportierten Verbindungen entsprechend subzellulär lokalisiert sind.

Proteine der Biotransformation finden sich bereits an den Barrieren zwischen Organismus und Umwelt, d.h. der Haut, den Schleimhäuten und vor allem dem durch die regelmäßige Nahrungsaufnahme mit Fremdstoffen intensiv konfrontierten Darm, um ein unerwünschtes Eindringen von vorneherein zu erschweren. Ein erheblicher Teil des Fremdstoffmetabolismus findet in der Leber statt, da das gesamte Blut des Magen-Darm-Traktes und alle darin enthaltenen Substanzen durch die Pfortader in die Leber gelangen. Sie stellt damit eine zweite Hauptbarriere für durch die Magen- oder Dünndarmschleimhaut resorbierte Stoffe dar, bevor diese den systemischen Blutkreislauf erreichen und ihre potentiellen Wirkungen auf den gesamten Organismus entfalten können.

Die Biotransformation wird in drei Phasen eingeteilt. In der Phase I finden die sogenannten Funktionalisierungsreaktionen statt, wobei durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse funktionelle Gruppen in eine Verbindung eingeführt oder freigelegt werden. Die bedeutendste Gruppe der Phase I Enzyme und der Biotransformation insgesamt ist die Superfamilie der Cytochrom P450 mischfunktionellen Monooxygenasen (CYPs). In der Phase II werden die funktionellen Gruppen durch Enzyme wie z.B. Uridin-5'-diphosphat-Glucuronosyltransferasen, Sulfotransferasen, Transacylasen oder N-Acetyltransferasen mit endogenen Verbindungen konjugiert. Zur Phase III schließlich werden aktive Transportprozesse von Xenobiotika durch Transporterproteine gezählt. Hierzu zählen die sogenannten *uptake*-Transporter wie das *Na⁺-dependent taurocholate co-transporting polypeptide* (NTCP) und die Familie der *organic anion transporting polypeptides* (OATPs), welche die Aufnahme von Verbindungen aus dem Pfortaderblut in den Hepatocyten ermöglichen, und die ATP-abhängigen Effluxtransporter wie P-Glykoprotein (P-gp), das Produkt des *multidrug resistance* Gens *MDR1*, und die *multidrug resistance-associated proteins* 2 und 3 (MRP2, MRP3), welche die Ausschleusung von Verbindungen aus z.B. dem Hepatocyten bewirken.

Im Verlauf der Biotransformationsreaktionen wird die Hydrophilie der metabolisierten Verbindungen im allgemeinen erhöht und so die Eliminierung aus dem Körper über Galle, Faeces und Urin erleichtert. Gleichzeitig erfolgt oftmals eine Inaktivierung bzw. Entgiftung der metabolisierten

Substanz, so dass die Kombination von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen und Transporterproteinen einen effektiven Abwehr-, Entgiftungs- und Kompartimentierungsmechanismus darstellt.

1.1.1 Polymorphismen und Induktion von Proteinen des Biotransformationssystems

Die Menge einzelner Proteine des Biotransformationssystems ist interindividuell sehr unterschiedlich. Dies kann zum einen durch genetische Polymorphismen begründet sein, bei denen bestimmte Mutationen eines betroffenen Gens dazu führen, dass dieses in verändertem Maße exprimiert, die korrekte mRNA- oder Proteinsynthese beeinflusst oder die Stabilität des Genprodukts verändert ist. Zum anderen kann die Expression mancher Proteine der Biotransformation wie z.B. CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4 oder MDR1 durch Exposition gegenüber bestimmten Verbindungen induziert werden, wobei diese Induktoren oft selbst Substrate der induzierten Proteine sind. Dies kann als eine Anpassungsreaktion des Organismus an eine erhöhte Belastung mit unerwünschten Fremdstoffen interpretiert werden. Die Induktion verläuft meist über eine Interaktion und Signaltransduktion durch Kernrezeptoren, welche eine gesteigerte Expression des induzierten Gens durch transkriptionelle Aktivierung bewirken. Durch die erhöhte Enzymmenge wird die Metabolismuskapazität und -geschwindigkeit aller vom induzierten Enzym umgesetzten Substrate erhöht, was zu einer veränderten Wirksamkeit von Pharmaka oder gegenseitiger Beeinflussung mehrerer Pharmaka (unerwünschte Arzneistoffwechselwirkung) oder endogener Metabolite führen kann.

1.1.2 Cytochrom P450 3A4

Eine der wichtigsten Cytochrom P450 Monooxygenasen ist das Cytochrom P450 3A4 (CYP3A4). CYP3A4 ist neben CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43 und den beiden Pseudogenen CYP3A5P1 und CYP3A5P2 Mitglied der beim Menschen einzigen Subfamilie 3A der CYP3 Familie. Es wird hauptsächlich in der Leber und im Darm exprimiert. In der Leber macht es mengenmäßig zwischen 30 und 60% des gesamten P450 Gehaltes aus (Waxman, 1999) und stellt im Darm ebenfalls das am stärksten exprimierte P450 Enzym dar. CYP3A4 metabolisiert ein sehr breites Spektrum von Pharmaka, welches klinisch wichtige Substrate wie Makrolidantibiotika (Erythromycin), Antiarrhythmika (Chinidin), Sedativa vom Benzodiazepintyp (Diazepam, Midazolam), Immunmodulatoren (Cyclosporin), antivirale Agentien (Ritonavir, Saquinavir), Antihistaminika (z.B. Astemizol, Terfenidin), Calciumkanalblocker (Nifedipin, Verapamil) und HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Lovastatin) umfasst. Insgesamt werden beinahe 60% aller gegenwärtig eingesetzten Medikamente zumindest teilweise durch CYP3A4 verstoffwechselt (Shimada et al., 1994). Möglicherweise ist CYP3A4 darüber hinaus an der Entstehung von Prostatakrebs und Leukämie durch eine Bioaktivierung von Procarcinogenen wie Aflatoxin B₁ (Aoyama et al., 1990), polycyclischen

aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs), N-Nitrosaminen (Hecht, 1999) und 6-Aminochrysen (Yamazaki et al., 1995) beteiligt. Neben dieser zentralen Rolle im Xenobiotikametabolismus ist CYP3A4 auch am Stoffwechsel endogener Steroide wie Testosteron und Progesteron (Pelkonen et al., 1998; Guengerich, 1999), aber auch Gallensäuren und deren Metabolite beteiligt (Teixeira et al., 1991; Araya et al., 1999).

Die Expression und Enzymaktivität von CYP3A4 in mikrosomalen Fraktionen menschlichen Lebergewebes ist interindividuell sehr variabel, die Expression schwankt um einen Faktor von 10 bis 100 (Guengerich et al., 1991; Shimada et al., 1994; Watkins, 1994), und auch die *in vivo* Enzymaktivität kann um bis zu einer Größenordnung variieren. Durch diese erhebliche Variabilität wird die Wirksamkeit und Sicherheit von Pharmaka, die durch CYP3A4 metabolisiert werden, beeinflusst. Die Ursachen für die interindividuelle Variabilität der CYP3A4 Expression sind bis dato nicht verstanden. Wahrscheinlich spielt sowohl die genetische Disposition als auch die individuelle Exposition gegenüber Pharmaka, Chemikalien aus der Umwelt und gegenüber Stoffen, die mit der Nahrung aufgenommen werden, eine Rolle (Tucker et al., 1998; Ozdemir et al., 2000). Bei der Suche nach Polymorphismen im CYP3A4 Gen wurden inzwischen mehr als 20 Allelvarianten identifiziert (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>), von denen einige zwar mit erhöhten oder erniedrigten katalytischen Aktivitäten assoziiert sind (Sata et al., 2000; Dai et al., 2001), deren Allelfrequenzen sind jedoch sehr niedrig. Ein *single nucleotide polymorphism* (SNP) an Position -290 in der 5' flankierenden Region konnte dabei mit Prostatakrebs und Leukämie assoziiert werden, obwohl keine funktionellen Konsequenzen dieses SNPs bekannt sind (Felix et al., 1998; Rebbeck et al., 1998). Eine Ursache für die starken Schwankungen in der CYP3A4 Expression liegt in der Induzierbarkeit dieses Enzyms. Die Induktion der Expression von CYP3A4 durch Xenobiotika ist ein gut dokumentiertes Phänomen (Watkins et al., 2001) und sie kann eine Reihe von klinisch wichtigen, unerwünschten Arzneimittelwechselwirkungen mit sich bringen (Michalets, 1998). Die *in vivo* Induktion von CYP3A4 ist in der Leber durch Rifampicin und Barbiturate (Ged et al., 1989) und im Darm durch Rifampicin gezeigt worden (Kolars et al., 1992). Für eine große Zahl weiterer Verbindungen, wie zum Beispiel Dexamethason, RU486, Spironolacton und Cyproteronacetat (Watkins et al., 1985; Pichard et al., 1992; Kocarek et al., 1995; Liddle et al., 1998), Clotrimazol, Phenobarbital, Phenytoin, Phenylbutazon, Sulfadimidin, Omeprazol und Lansoprazol, und Metyrapon (Pichard et al., 1990; Maurice et al., 1992; Schuetz et al., 1993; Kocarek et al., 1995; Wright et al., 1996) wurde eine Induktion in Primärkulturen humaner Hepatocyten gefunden (Watkins et al., 1985; Ged et al., 1989; Watkins et al., 1989; Pichard et al., 1990; Strom et al., 1996; LeCluyse, 2001). Einer der effektivsten Induktoren der CYP3A4 Expression *in vitro* und *in vivo* ist das Makrolidantibiotikum Rifampicin (Combalbert et al., 1989; Pichard et al., 1990; Schuetz et al., 1993; Kocarek et al., 1995).

Durch die hohe intraindividuelle Expressionsvariabilität und das breite Spektrum an Substraten, Induktoren und Inhibitoren von CYP3A4 besteht die Gefahr der Entwicklung von klinisch bedeutsamen, unerwünschten Arzneimittelwechselwirkungen, besonders in Bereichen der Therapie in

denen tendenziell mehrere Wirkstoffe gleichzeitig eingesetzt werden, d.h. vor allem bei der Behandlung älterer Menschen und der Langzeitprophylaxe von psychischen Störungen (Thummel et al., 1998). In der Tat wurde eine Reihe von unerwünschten Arzneimittelwechselwirkungen unter Beteiligung des Cytochrom P450 3A4 beobachtet (Venkatesan, 1992; Wilkinson, 1996; Ameer et al., 1997; Bertz et al., 1997; Lin, J. H. et al., 1997). Die Schwere solcher Arzneimittelinteraktionen hängt dabei von verschiedenen Parametern wie dem therapeutischen Index, den relativen Konzentrationen der Verbindungen und deren Metaboliten sowie den pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern der beteiligten Wirkstoffe ab.

Die Induktion von CYP3A4 wird mechanistisch hauptsächlich durch die Kernrezeptoren Pregnan-X-Rezeptor (PXR) und *Constitutive Androstane Receptor* (CAR) vermittelt (Lehmann et al., 1998; Moore et al., 2000b), eine indirekte Vermittlung durch den Glucocorticoidrezeptor (GR) wird gegenwärtig diskutiert (Sueyoshi et al., 1999a; Moore et al., 2000b; Pascussi et al., 2000b).

1.2 Kernrezeptoren

1.2.1 Allgemeines

Um ihre komplexe Entwicklung während der Embryogenese und die Aufrechterhaltung ihrer korrekten Struktur und Funktion während ihrer Lebensspanne zu gewährleisten, bedürfen vielzellige Organismen einer spezifischen, exakten interzellulären Kommunikation. Während Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren und Peptidhormone an membranständige Rezeptoren binden und dadurch Ionenkanäle, intrazelluläre Kinasekaskaden oder JAK-STAT/Smad-Signaltransduktionswege aktivieren oder modulieren, können kleine, hydrophobe Signalmoleküle wie Steroidhormone und bestimmte Vitamine oder Metabolite, sofern sie nicht bereits im Inneren der Zelle gebildet werden, die Zellmembran überwinden und in der Zelle an Kernrezeptoren binden. Die Kernrezeptoren sind von großer Bedeutung für die Kommunikation und Signaltransduktion, da sie durch direkte physikalische Interaktion mit hormonellen, metabolischen und anderen regulatorischen Signalmolekülen verschiedene intrazelluläre und extrazelluläre Signale wahrnehmen. Gleichzeitig unterliegen sie selbst, durch posttranslationale Modifikation einer Modulation und können regulierende Funktion auf andere Signaltransduktionswege ausüben (*cross talk*), so dass die Gesamtheit der Kernrezeptoren die Vielzahl der wahrgenommenen Signale quasi integriert und die für die Zelle oder den Organismus adäquate Reaktion durch Initiation oder Modulation der Expression definierter Gene bewirkt. Gene praktisch aller Aspekte des vielzelligen Organismus wie Embryogenese, Zelldifferenzierung, Homöostase, Reproduktion, Zellwachstum, Proliferation und Zelltod/Apoptose, werden auf diese Weise reguliert. Das Zusammenspiel eines so initiierten genetischen Programms stellt die Grundlage für die Entwicklung, Erhaltung und Reaktion eines vielzelligen Organismus auf äußere und innere Stimuli dar. Die essentielle Bedeutung der Kernrezeptoren für die Funktion von Organismen lässt sich daran

erkennen, dass viele Versuchstiere, die bestimmte Rezeptoren nicht exprimieren können, sogenannte *knock out*-Tiere, und insbesondere Tiere, die sogar mehrere Rezeptoren nicht exprimieren, bereits *in utero* oder perinatal sterben, schwere Organmissbildungen aufweisen (Beato et al., 1995; Kastner et al., 1995), unfruchtbar sind oder eine verkürzte Lebensspanne haben (Luo et al., 1994; Parker et al., 1996).

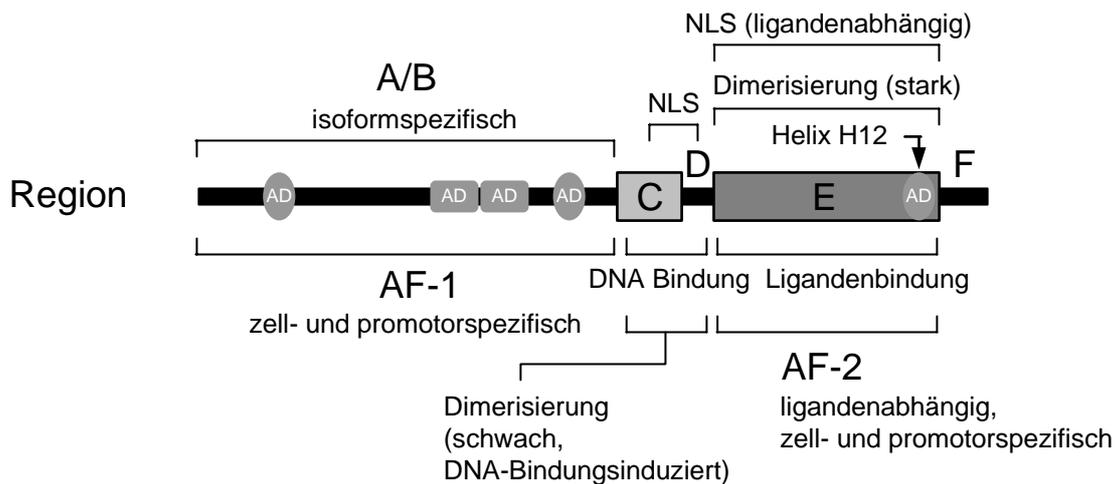


Abbildung 1. Schematische Darstellung des strukturellen und funktionellen Aufbaus der Kernrezeptoren.

Die evolutionär am besten konservierten Regionen C und E sind als Boxen dargestellt und stimmen weitgehend mit der DNA-Bindungsdomäne (DBD) bzw. der Ligandenbindungsdomäne (LBD) überein. Die weniger gut konservierten Regionen A/B, D und F sind als schwarze Balken dargestellt. Bei einigen Rezeptoren fehlt die F-Region. Zwei *transcription activation functions* (AFs) sind bei vielen Rezeptoren beschrieben, die konstitutiv aktive AF-1 in der Region A/B und die ligandenabhängige AF-2 in Region F. Innerhalb der Aktivierungsfunktionen des Östrogenrezeptors, des Progesteronrezeptors, des Thyroidhormonrezeptors und von Retinoidrezeptoren wurden sogenannte *autonomous transactivation domains* (AD) identifiziert. NLS, *nuclear localization signal* (Kernlokalisationssignal). (Nach: *The Nuclear Receptor Facts Book*, V. Laudet und H. Gronemeyer).

Die Kernrezeptoren sind eine Familie von Transkriptionsfaktoren und besitzen einen gemeinsamen modularen Aufbau aus fünf bis sechs konservierten Domänen, die für spezifische Funktionen verantwortlich sind (Abbildung 1). Die Nomenklatur der Kernrezeptoren war bis vor kurzem uneinheitlich, da für einige Rezeptoren mehrere Bezeichnungen gebräuchlich sind und selbst orthologe Rezeptoren verschiedener Spezies komplett unterschiedliche Bezeichnungen tragen. Zur Vereinfachung wurde vom Komitee für Nomenklatur der Kernrezeptoren eine Nomenklatur für die einzelnen Subfamilien und Gruppen von Rezeptoren empfohlen, die auf dem phylogenetischen Stammbaum aller bekannten Rezeptoren basiert, insbesondere auf der evolutionären Entwicklung der DNA Bindungsdomäne (DBD, C-Domäne) und der Ligandenbindungsdomäne (LBD, E-Domäne). Es ergibt sich ein systematischer Name für jeden Rezeptor, z.B. NR2B1 für RXR α , wobei NR für *nuclear receptor* (Kernrezeptor), 2 für die Subfamilie 2, B für Gruppe B und 1 für Gen 1 steht. Die

Unterteilung der Familie der Kernrezeptoren in Subfamilien wird anhand der Sequenzhomologien der Rezeptoren zueinander vorgenommen. Die Anzahl verschiedener Kernrezeptoren innerhalb eines Organismus variiert von bis zu beinahe 200 gefundenen Kernrezeptorsequenzen im Genom von *Caenorhabditis elegans* (Sluder et al., 1999) bis zu 21 in *Drosophila* (Sluder et al., 1999). Das menschliche Genom enthält 49 ± 1 Kernrezeptorgene.

Ein Hauptunterschied der Kernrezeptoren zu anderen Transkriptionsfaktoren ist ihre Fähigkeit zur Bindung kleiner, hydrophober Moleküle. Diese Liganden, Hormone, Vitamine oder Metabolite, stellen regulatorische Signale dar, die die transkriptionelle Aktivität des Rezeptors nach Bindung des Liganden verändern. Lange wurde zwischen den klassischen Kernrezeptoren mit bekannten Liganden und den sogenannten Waisenrezeptoren (*orphan receptors*), für die kein eigentlicher Ligand existiert oder noch nicht identifiziert ist, unterschieden. In den letzten Jahren wurden jedoch immer mehr Liganden für ehemalige Waisenrezeptoren identifiziert, so dass diese Einteilung mittlerweile immer weniger sinnvoll erscheint (Mangelsdorf et al., 1995; Giguere, 1999; Kliewer et al., 1999).

Das Spektrum der Kernrezeptorliganden umfasst Vitamine wie Vitamin D₃ (Vitamin D-Rezeptor, VDR, NR1I1), den Vitamin A-Abkömmling Retinsäure (Retinsäurerezeptor, RARs, NR1B; Retinsäure-X-Rezeptor, RXRs, NR2B), Gallensäuren (Farnesoid-X-Rezeptor, FXR, NR1H4; Pregnan-X-Rezeptor, PXR, NR1I2), Fettsäuren, Eicosanoide (*Peroxisome Proliferation Activating Receptor*, PPAR, NR1C), Oxysterole (*Liver X Receptor*, LXR, NR1H), und Steroidhormone wie Östrogene, Progesterone, Glucocorticoide, Mineralocorticoide, Androgene (Östrogenrezeptor, ER, NR3A; Progesteronrezeptor, PR, NR3C3; Glucocorticoidrezeptor, GR, NR3C1; Mineralocorticoidrezeptor, MR, NR3C2; Androgenrezeptor, AR, NR3C4; *Constitutive Androstane Receptor*, CAR, NR1I3). Kernrezeptoren sind also an endokrinen (Steroidhormonrezeptoren), autokrinen/parokrinen (Retinoidrezeptoren) und intrakrinen („metabolische Rezeptoren“) Signaltransduktionswegen beteiligt.

1.2.2 Funktion von Kernrezeptoren

1.2.2.1 Prinzip der DNA-Erkennung und -Bindung von Kernrezeptoren

Alle Kernrezeptoren erkennen Variationen desselben Hexamer-Grundmotivs 5'-RGKTCA-3'. Durch die Variation einzelner Basen, die Erweiterung des Motivs, dessen Duplikation und die relative Orientierung zweier Motive zueinander entsteht eine Vielzahl möglicher sogenannter *response elements* (REs) (Abbildung 2). Diese werden durch das Zusammenspiel der Charakteristik der REs, d.h. deren exakte Nucleotidsequenz, die Degeneration der Hexamer motive, die Länge und Nucleotidsequenz des als *spacer* bezeichneten Sequenzstücks zwischen den beiden Halbseitenmotiven und die Orientierung der beiden Motive zueinander, mit den an der Protein-DNA-Interaktion beteiligten Aminosäureresten der beteiligten Rezeptorproteine spezifisch erkannt. Neben den klassischen DNA Erkennungsmotiven aus zwei Hexamerhalbseiten existieren auch solche, die aus drei Motiven oder nur aus einem Motiv bestehen.

Kernrezeptoren binden ihre zugehörigen *response elements* als Monomere, Homodimere oder als Heterodimere mit anderen Rezeptoren. Durch die Dimerisierung und die damit einhergehende Kooperativität kann sich die Affinität und Spezifität der DNA Bindung verändern. Während Steroidhormonrezeptoren im allgemeinen als Homodimere binden, können RAR, RXR, TR und VDR sowohl homodimerisieren als auch heterodimerisieren. Die 9-cis-Retinsäure-Rezeptoren (RXRs) spielen dabei eine besondere Rolle bei der Signaltransduktion durch Kernrezeptoren, da sie neben der Homodimerisierung auch als promiskuer Heterodimerisierungspartner für eine Reihe von Rezeptoren fungieren können.

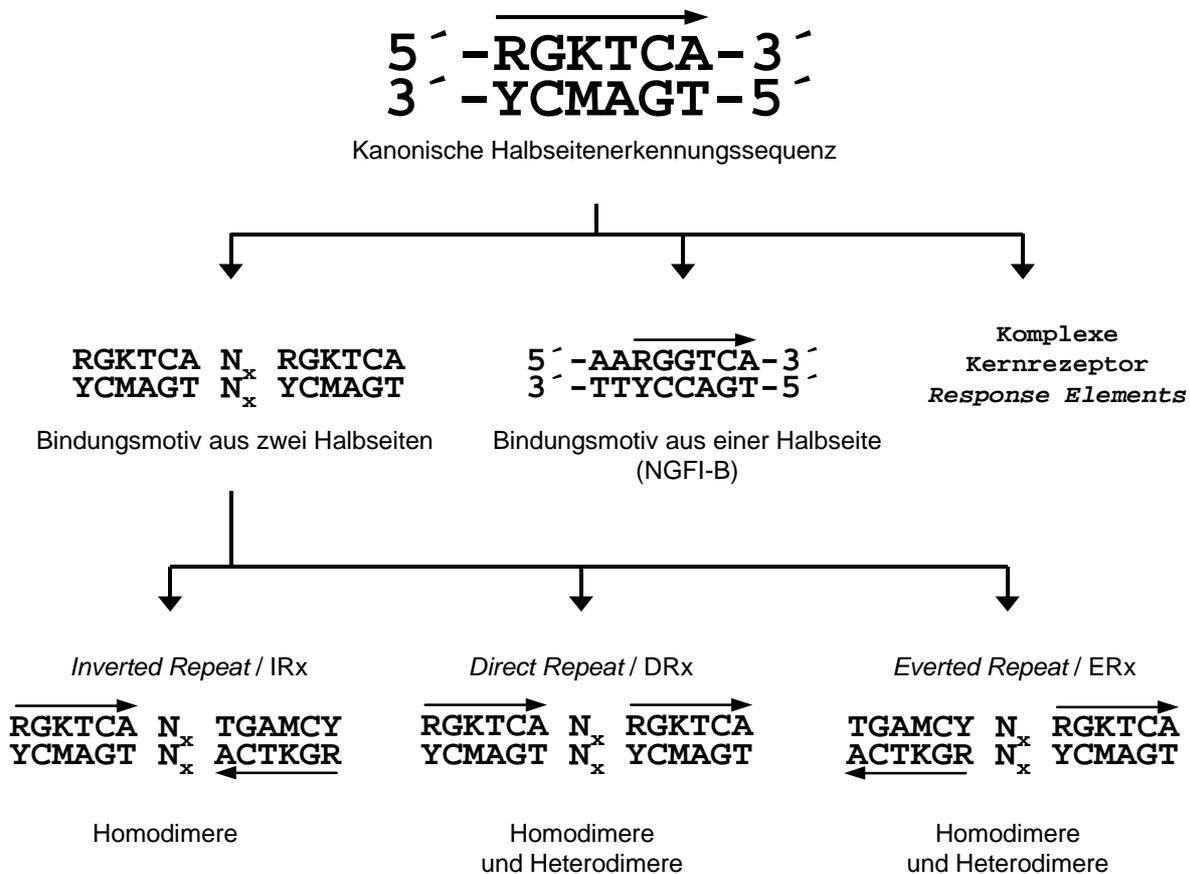


Abbildung 2. Kernrezeptor *response elements*. Die kanonische Erkennungssequenz ist 5'-RKGTC A-3'. In Kombination mit zwei Adenosylresten ergibt sich das *response element* (RE) von NGFI-B. Durch Duplikation des Halbseitenmotivs ergeben sich symmetrische *inverted repeat* (IRx), polare *direct repeat* (DRx) und symmetrische *everted repeat* (ERx) REs, wobei x die Anzahl der Nucleotidreste bezeichnet, durch die die beiden Halbseitenmotive voneinander separiert sind. Im Allgemeinen sind die Erkennungsmotive imperfekt, d.h. die Sequenz einer oder beider Halbseitenmotive weicht von der rezeptorspezifisch idealen Erkennungssequenz in einem oder mehreren Nucleotidresten ab. DRx Elemente können Rezeptorhomodimere und -heterodimere binden, IRx Elemente Homodimere und ERx Elemente Homo- und Heterodimere. *Response elements* aus mehr als zwei Halbseitenmotiven werden als komplexe *response elements* bezeichnet, welche teilweise in verschachtelter Anordnung vorliegen. (Nach: *The Nuclear Receptor Facts Book*, V.Laudet und H. Gronemeyer).

Das Gleichgewicht zwischen der Bildung von Homodimeren und Heterodimeren wird dabei durch die Stabilität der Wechselwirkungen der an der Dimerbildung beteiligten Aminosäurereste sowie die Größe der Fläche mit der die beiden Monomere interagieren, bestimmt. Die relativ geringe Interaktionsfläche von 1000 \AA^2 , die bei der Bildung von Homo- oder Heterodimeren unter Beteiligung von RXR entsteht und die damit einhergehende relativ geringe Stabilität, die Interaktionsfläche eines Homodimers des Östrogenrezeptors beläuft sich im Vergleich auf $\sim 1700 \text{ \AA}^2$, stellt eine mögliche Erklärung für das promiske Verhalten dieses Rezeptors dar. An der Rezeptordimerisierung sind sowohl Bereiche in der DNA-Bindungsdomäne der Rezeptoren als auch Bereiche der Ligandenbindungsdomäne der Rezeptoren beteiligt, wobei erstere nur bei der Bindung an DNA aktiv sind, und letztere hauptsächlich im DNA-ungebundenen Zustand die Dimerisierung vermitteln.

Neben ihrer Funktion bei der Rezeptordimerisierung ist die DNA Bindungsdomäne vor allem für die Erkennung des zugehörigen DNA Motivs verantwortlich (Green et al., 1987). Dabei spielen der aminoterminaler Zinkfinger, an dessen carboxyterminalem „Knöchel“ 2 bis 3 als P-box (*proximal box*) bezeichnete Aminosäurereste für eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Halbseitenmotiven sorgen (Green et al., 1988), und der als D-box (*distal box*) bezeichnete aminoterminaler „Knöchel“ des carboxyterminalen Zinkfingers, der an der Unterscheidung zwischen palindromischen Erkennungssequenzen mit *spacern* unterschiedlicher Länge beteiligt ist (Umesono et al., 1989), eine Rolle. An der durch den *spacer* vermittelten spezifischen Erkennung ist außerdem die sogenannte A-box beteiligt (Zechel et al., 1994a; Zechel et al., 1994b).

1.2.2.2 Prinzip der Ligandenbindung von Kernrezeptoren

Für die spezifische Bindung von Liganden ist die Ligandenbindungsdomäne verantwortlich. Die LBDs aller Kernrezeptoren sind gleichartig als antiparalleles, dreischichtiges Sandwich aufgebaut, bestehend aus 12 α -Helices (H1 bis H12) und einer β -Schleife (Weatherman et al., 1999). Ein Vergleich der Struktur der apo-LBD, der Ligandenbindungsdomäne in Abwesenheit eines Liganden, und der holo-LBD, der LBD in Anwesenheit eines Agonisten, zeigt, dass die Aktivierungsfunktion AF-2 bei allen Kernrezeptoren durch einen gemeinsamen, als Mausefallen-Modell bezeichneten Mechanismus transkriptionell kompetent wird. Diese Bezeichnung rührt von der Tatsache her, dass mit Ausnahme beim PPAR γ die Liganden in allen bisher bekannten Röntgenkristallstrukturen von Kernrezeptoren ohne erkennbaren Zugang im Protein eingebettet sind. Die Ligandenbindungstasche (*ligand binding pocket*, LBP) ist fast ausschließlich mit hydrophoben Aminosäureresten ausgekleidet. Einzelne polare Reste am hinteren Ende der LBP fungieren quasi als Ankerpunkt für den Liganden oder spielen eine essentielle Rolle bei der korrekten Positionierung und Ausrichtung desselben und bewirken damit eine Selektivität des Rezeptors. Die Selektivität des Rezeptors wird weiterhin durch die genaue Passform eines Liganden in die zugehörige LBP bestimmt, da bei genauer Übereinstimmung der Formen eine

maximale hydrophobe Wechselwirkung zwischen Ligand und LBP und damit eine hohe Stabilität der Bindung zustandekommt.

Nach der Bindung des Liganden dichtet die Helix H12 durch umfangreiche Konformationsänderung des Rezeptors als eine Art Deckel die Ligandenbindungstasche ab und stabilisiert so die Ligandenbindung. Durch die durch Agonisten bewirkten Konformationsänderungen entstehen distinkte, neue Oberflächenstrukturen auf der holo-LBD, die eine Interaktion mit *bona fide* Co-Aktivatoren und/oder die Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren erlauben, und die gleichzeitig zur Dissoziation von Co-Repressorproteinen führen, welche zuvor an der Oberfläche der apo-LBD gebunden waren.

Die Kernrezeptoren liegen generell in einem Konformationsgleichgewicht zwischen der apo- und holo-LBD Form vor, welches durch intermolekulare Wechselwirkungen der Helix H12, wie z.B. der Ausbildung von Salzbrücken oder hydrophobe Kontakte beeinflusst werden kann. Daraus folgt, dass die apo-LBD Konformation nicht notwendigerweise der Grundzustand ist, so dass eine konstitutive Aktivität von Kernrezeptoren ohne Bindung von zugehörigen Liganden möglich ist, wie zum Beispiel beim *Constitutive Androstane Receptor* CAR. Auf dieses Gleichgewicht können außerdem andere Einflussgrößen wie z.B. die gegebene Konzentration an Co-Aktivatoren oder posttranslationale Modifikationen des Rezeptors einwirken (White et al., 1997; Voegel et al., 1998).

1.2.2.3 Molekulare Mechanismen der transkriptionellen Regulation durch Kernrezeptoren

Die Expression eines Gens kann auf verschiedenen Ebenen wie Transkription, RNA Prozessierung, Translation und posttranslationale Modifikation reguliert werden und selbst auf der transkriptionellen Ebene kann eine Regulation an mehreren Stellen stattfinden. Die transkriptionelle Aktivität eines Gens kann epigenetisch auf der Ebene der Chromatinstruktur durch Methylierung oder auf der Ebene des Zusammenbaus und der Aktivität der initiiierenden und elongierenden Polymerasekomplexe kontrolliert werden. Die Regulation der Transkription durch Kernrezeptoren geschieht durch die Beeinflussung der Initiation der Transkription durch die RNA Polymerase II.

Die meisten Kernrezeptoren besitzen zwei distinkte, die Transkription aktivierende Regionen, die als *activation function* AF-1 und AF-2 bezeichnet werden. Sowohl AF-1 als auch AF-2 werden nach Ligandenbindung aktiv, wobei AF-1 teilweise auch konstitutiv aktiv ist. Die Aktivierungsfunktionen regulieren durch Kooperation und synergistische Effekte mit anderen promotorgebundenen Transkriptionsfaktoren sowohl promotorkontextabhängig als auch zelltypspezifisch die Transkriptionsinitiation (Nagpal et al., 1992). Für die Vermittlung des von den Kernrezeptoren in Form des Liganden aufgenommenen Signals zum molekularen Zieffekt der Transkription eines Gens werden weitere Faktoren benötigt. Diese werden als *transcription intermediary factors* (TIFs) oder Co-Regulatoren bezeichnet und werden in Co-Aktivatoren und Co-Repressoren unterteilt.

Co-Aktivatoren besitzen ein oder mehrere in kurzen α -helicalen Abschnitten liegende LXXLL *nuclear receptor box* Motive (NR Box) (Heery et al., 1997). Durch die ligandeninduzierte Repositionierung

der Helix H12 des Kernrezeptors entsteht eine hydrophobe Spalte mit einer „geladenen Klammer“, welche zusammen mit den umgebenden Aminosäureresten die amphipathische LXXLL NR Box-Helix des Co-Aktivators aufnimmt und so mit diesem interagiert (Nolte et al., 1998; Shiau et al., 1998; Gampe et al., 2000). Viele Co-Aktivatoren wie z.B. CBP, p300, P/CAF, SRC-1, P/CIP oder GCN5 besitzen intrinsische Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität und/oder rekrutieren unter Bildung großer Co-Aktivator-Komplexe Proteine, die eine solche besitzen. Durch die HAT-Aktivität werden bestimmte Aminoacylreste in den aminoterminalen Schwänzen verschiedener Histone acetyliert, was zu einer Verringerung der Affinität der Histone zur DNA führt. Dadurch ergibt sich eine Öffnung der Chromatinstruktur (Chen, H. et al., 1999). Der weitere Verlauf der kernrezeptorvermittelten Transkriptionsinitiation ist noch nicht vollständig verstanden. Es wird jedoch angenommen, dass durch die HAT-Aktivität des Co-Aktivator-Komplexes die Co-Aktivatoren selbst acetyliert werden (Chen, H. et al., 1999), was zur Dissoziation des Co-Aktivator-Komplexes vom Kernrezeptor führt. Anschließend wird durch Interaktion der agonistengebundenen LBD des Kernrezeptors mit der LXXLL NR Box der DRIP205/TRAP220 (Yang et al., 1999) bezeichneten Untereinheit des *Mammalian Mediator Complex* das RNA Polymerase II Holoenzym rekrutiert

Die funktionellen Gegenspieler der Co-Aktivatoren sind die Co-Repressoren wie z.B. NcoR oder SMRT, welche die Kernrezeptoren im ligandenfreien Zustand binden. Co-Repressoren besitzen ein konserviertes CoNR Box Motiv, welches mit einer Oberfläche der LBD des Kernrezeptors interagiert, die topologisch sehr ähnlich wie die vom LXXLL Motiv der Co-Aktivatoren erkannte Oberfläche ist, bei der aber die Helix H12 der Kernrezeptoren nicht beteiligt ist (Hu et al., 1999). Man nimmt an, dass Co-Repressoren Bestandteile von hochmolekularen Komplexen mit Histondeacetylaseaktivität sind oder diese Komplexe rekrutieren und so den von Co-Aktivator-Komplexen vermittelten Effekten entgegenwirken oder diese sogar umkehren.

1.3 Der Pregnan-X-Rezeptor

1.3.1 Allgemeines

Der Pregnan-X-Rezeptor (PXR, NR1I2) ist ein Mitglied der Subfamilie NR1I der Kernrezeptoren, zu der neben PXR noch der Vitamin D-Rezeptor der Säugetiere (VDR, NR1I1) und der *Constitutive Androstane Receptor* (CAR, NR1I3) gehören. Der Pregnan-X-Rezeptor des Menschen wurde von drei Forschergruppen ungefähr gleichzeitig kloniert und wird daher alternativ auch als *Pregnane-activated Receptor* (PAR) (Bertilsson et al., 1998) oder *Steroid and Xenobiotic Receptor* (SXR) (Blumberg et al., 1998) bezeichnet.

Die genomische Struktur des menschlichen PXR Gens besteht aus 10 Exons und 9 Introns und erstreckt sich über ungefähr 30 kb genomischer DNA auf dem Chromosomenabschnitt 3q13-21 (Hustert et al., 2001b; Zhang, J. et al., 2001). Im Menschen wird der Pregnan-X-Rezeptor in der Leber

stark und in etwas schwächerem Ausmaß im Dünndarm exprimiert (Bertilsson et al., 1998; Blumberg et al., 1998; Lehmann et al., 1998). PXR Transkripte wurden außerdem auch in normalem und neoplastischem Brustgewebe nachgewiesen (Dotzlaw et al., 1999). In Mäusen wurde beobachtet, dass die Expression von PXR während der Schwangerschaft erhöht ist (Masuyama et al., 2001).

Neben dem PXR des Menschen (Bertilsson et al., 1998; Blumberg et al., 1998; Lehmann et al., 1998) wurden inzwischen auch die orthologen Rezeptoren von Affen, Hunden, Kaninchen, Ratten und die nahe verwandten Rezeptoren des Huhns (*Chicken Xenobiotic Receptor*, CXR) und von Fischen kloniert (Zhang, H. et al., 1999; Handschin et al., 2000; Jones et al., 2000; Savas et al., 2000; Moore et al., 2002). Die DNA-Bindungsdomänen der PXR Orthologen der Säugetiere sind mit mehr als 95% Identität in der Aminosäuresequenz hochkonserviert (Jones et al., 2000). Die Ligandenbindungsdomänen zeigen dagegen im Vergleich mit anderen Kernrezeptoren eine weitaus größere Interspeziesdivergenz, so sind z.B. die LBD des PXR des Menschen und die der Ratte nur zu 76% identisch, wohingegen die LBDs der meisten anderen orthologen Kernrezeptoren von Mensch und Ratte zu mehr als 90% übereinstimmen.

Sowohl vom PXR der Maus (Kliwer et al., 1998) als auch von dem des Menschen existieren Proteinisoformen. Der menschlichen Proteinvariante hPXR.2 fehlen 37 Aminosäuren in der Ligandenbindungsdomäne (Dotzlaw et al., 1999). Die beiden ersten Exons des PXR Gens sind alternative 5'-Transkriptenden, wobei bei der mit hPAR-2 bezeichneten Isoform der Aminoterminus um 39 Aminosäuren verlängert ist (Bertilsson et al., 1998).

1.3.2 Liganden des Pregnan-X-Rezeptors

In Reporterexperimenten wird der Pregnan-X-Rezeptor durch eine große Zahl strukturell sehr unterschiedlicher Liganden aktiviert, darunter einige wichtige in der medikamentösen Therapie eingesetzte Wirkstoffe (Tabelle 1). Unter den aktivierenden Verbindungen sind bekannte CYP3A Induktoren wie Rifampicin, Metyrapon, Clotrimazol, Phenobarbital, Spironolacton (Lehmann et al., 1998; Goodwin et al., 1999; Wright, 1999), der Calciumkanalblocker Nifedipin (Drocourt et al., 2001), der HIV Proteaseinhibitor Ritonavir (Dussault et al., 2001), die Chemotherapeutika Paclitaxel (Synold et al., 2001), Tamoxifen und 4-Hydroxytamoxifen (Desai et al., 2002), das Antidiabetikum Troglitazon (Jones et al., 2000), die Cholesterinsenker Lovastatin und SR12813 (Lehmann et al., 1998; Jones et al., 2000) aber auch chlororganische Verbindungen wie nichtplanare polychlorierte Biphenyle (PCBs) (Schuetz et al., 1998), chlororganische Pestizide wie Trans-Nonachlor (Lehmann et al., 1998; Jones et al., 2000) und 1,1-Dichlor-2,2-bis(p-chlorphenyl)ethylen (DDE) (Wyde et al., 2003) und die *Endocrine Disrupting Chemicals* (EDCs) Bisphenol A, Diethylhexylphtalat und Nonylphenol (Masuyama et al., 2000; Takeshita et al., 2001). Weiterhin wird der humane PXR auch durch natürlich vorkommende Steroidverbindungen wie den Progesteronmetaboliten 5 β -Pregnan-3,20-dion (Moore et al., 2000b), Oestradiol (Blumberg et al., 1998), in geringerem Ausmaß durch Corticosteron (Jones et

al., 2000), sowie durch die sekundäre Gallensäure Lithocholsäure (LCA) und deren Metaboliten 3-Ketolithocholsäure (Staudinger, J. L. et al., 2001b; Xie et al., 2001) aktiviert. Als antagonistisch wirkender Ligand wurde das Ecteinascidin 743 (ET-743), ein potentes antineoplastisches Agens, beschrieben, welches die Aktivierung von PXR durch SR12813 oder Paclitaxel und die Induktion der PXR Zielgene CYP3A4 und MDR1 in einer humanen intestinalen Zelllinie blockierte (Synold et al., 2001).

Tabelle 1. In Reporterassays identifizierte Liganden des Pregnan-X-Rezeptors des Menschen.

Verbindung	Therapeutischer Gebrauch / Stoffklasse	Literaturreferenz
Rifampicin	Antibiotikum	(Lehmann et al., 1998) (Blumberg et al., 1998) (Jones et al., 2000)
Metyrapon	Diagnostikum	(Wright, 1999)
Clotrimazol	Antimycotikum	(Lehmann et al., 1998)
Phenobarbital	Antikonvulsivum, Sedativum	(Lehmann et al., 1998)
Spirolacton	Antihypertensivum	(Lehmann et al., 1998)
Nifedipin	Antihypertensivum	(Drocourt et al., 2001)
Ritonavir	HIV Protease Inhibitor	(Dussault et al., 2001)
Paclitaxel	Chemotherapeutikum	(Synold et al., 2001)
Tamoxifen	Chemotherapeutikum	(Desai et al., 2002)
4-Hydroxytamoxifen	Chemotherapeutikum	(Desai et al., 2002)
Troglitazon	Antidiabetikum	(Jones et al., 2000)
Lovastatin	Cholesterinsenker	(Lehmann et al., 1998)
SR12813	Cholesterinsenker	(Jones et al., 2000)
Mifepriston (RU486)	Abortifaciens	(Lehmann et al., 1998)
Johanniskraut	Antidepressivum	(Wentworth et al., 2000)
Dexamethason	Glucocorticoid	(Lehmann et al., 1998)
Cyproteronacetat	Antiandrogen	(Lehmann et al., 1998)
5 β -Pregnan-3,20-dion	Endogenes Steroid	(Lehmann et al., 1998) (Moore et al., 2000b)
Oestradiol	Endogenes Steroid	(Blumberg et al., 1998) (Jones et al., 2000)
Corticosteron	Endogenes Steroid	(Blumberg et al., 1998) (Jones et al., 2000)
Lithocholsäure	Gallensäure	(Staudinger, J. L. et al., 2001b)
Ketolithocholsäure	Gallensäure	(Staudinger, J. L. et al., 2001b)
PCB	Industrielles Lösemittel	(Schuetz et al., 1998)
Trans-Nonachlor	Chlororganisches Pestizid	(Lehmann et al., 1998) (Jones et al., 2000) (Schuetz et al., 1998)
1,1-Dichlor-2,2-bis(p-chlorphenyl)ethylen (DDE)	Chlororganisches Pestizid (DDT-Metabolit)	(Wyde et al., 2003)
Bisphenol A	<i>Endocrine disrupting chemical</i>	(Takeshita et al., 2001)
Nonylphenol	<i>Endocrine disrupting chemical</i>	(Masuyama et al., 2000)
Diethylhexylphtalat	<i>Endocrine disrupting chemical</i>	(Masuyama et al., 2000)

Die direkte Bindung als Ligand an PXR wurde bisher für Rifampicin, Clotrimazol, Phenobarbital, Troglitazon und Ritonavir (Kliewer et al., 1998; Lehmann et al., 1998; Jones et al., 2000; Dussault et al., 2001) und für die natürlichen Steroide 5 β -Pregnan-3,20-dion, Corticosteron und Oestradiol (Jones et al., 2000) mittels *scintillation proximity assay* (SPA) oder *co-activator receptor ligand assay* (CARLA) gezeigt. Die Fähigkeit von PXR, ein so bemerkenswert breites Spektrum von unterschiedlichen Verbindungen mit Molekulargewichten von 250 kD bis über 800 kD zu binden, ist in der Familie der Kernrezeptoren einzigartig.

1.3.3 Struktur und Aufbau der Ligandenbindungsdomäne von PXR

Ursachen für die Fähigkeit, eine solche Ligandenvielfalt zu binden und so eine Funktion als Xenobiotika- und Gallensäuresensor ausüben zu können, wurden bei röntgenkristallographischen Untersuchungen der dreidimensionalen Struktur der LBD des menschlichen PXR im Komplex mit den hochaffinen Liganden SR12813 und Hyperforin gefunden (Watkins et al., 2001; Watkins et al., 2003). Die LBD ist in der für die Superfamilie der Kernrezeptoren typischen Art als dreischichtiges Sandwich aus α -Helices und einer β -Schleife gefaltet, weist aber darüber hinaus mehrere einzigartige Eigenschaften auf, die im Aufbau anderer Kernrezeptoren nicht vorkommen. An der Stelle, an der bei anderen Kernrezeptoren die Helix 2 liegt, besitzt PXR einen *turn* aus 4 Aminosäureresten und ein pseudohelicales Segment, das gewissermaßen den Boden der Ligandenbindungstasche bildet. Hieran angrenzend besitzt PXR eine β -Faltblattstruktur aus 5 β -*strands* anstelle der üblichen 3 anderer Kernrezeptoren. Durch die zwei zusätzlichen β -*strands* $\beta 1$ und $\beta 1'$ kann die Helix 6 zu einer flexiblen Schleife aufgewunden werden, so dass die sphärische Ligandenbindungstasche ihr Volumen bis auf 1150 Å³ vergrößern kann und so Liganden unterschiedlicher Struktur und Größe aufnehmen kann. Die Ligandenbindungstasche wird von 28 Aminoacylresten gebildet, von denen 20 hydrophob sind, die 8 weiteren Reste, von denen 4 polar und 4 geladen sind, sind gleichmäßig in der Bindungstasche verteilt. Die Ko-Kristallstruktur der LBD des PXR mit dem Liganden SR12813 zeigt, dass dieser in 3 unterschiedlichen Ausrichtungen in der Bindungstasche gebunden werden kann, ein weiterer Beleg für die variablen und vielseitigen Ligandenbindungseigenschaften von PXR. Die speziesspezifischen Liganden- und Aktivierungseigenschaften einzelner Verbindungen sind wahrscheinlich zumindest teilweise durch die in den verschiedenen Spezies unterschiedlichen an der Bildung der Ligandenbindungstasche beteiligten Aminosäuren erklärbar. So bestehen z.B. zwischen der Bindungstasche des PXR des Menschen und der Maus 5 nichtkonservative Aminosäureaustausche. Durch Mutation einiger Aminosäuren der Ligandenbindungstasche der Maus zu ihren Äquivalenten im menschlichen PXR konnte ein hybrider Rezeptor mit einem Ligandenaktivierungsprofil ähnlich dem des menschlichen PXR erzeugt werden.

1.3.4 DNA Bindungseigenschaften von PXR

PXR bindet als Mitglied der NR1 Subfamilie obligat als Heterodimer mit dem 9-cis-Retinsäure-Rezeptor (RXR α , NR2B1; RXR β , NR2B2) an *response elements*, die aus zwei Halbseiten des Konsensus-Kernrezeptorbindungsmotivs RGKTCA bestehen. PXR/RXR Heterodimere binden an *response elements* von DR3 Typ im proximalen *CYP3A23*, im *CYP3A2* und im *CYP3A4 Enhancer* (Kliwer et al., 1998; Goodwin et al., 1999), an ER6 REs im proximalen Promotor des *CYP3A4* Gens (Bertilsson et al., 1998; Blumberg et al., 1998; Lehmann et al., 1998) und DR4 und DR5 Elemente (Blumberg et al., 1998), wie sie in den Promotorregionen mehrerer von PXR regulierter Gene vorkommen, zum Beispiel bei Genen der *CYP2B* Subfamilie (Xie et al., 2000b; Goodwin et al., 2001) oder dem *MDR1* Gen (Geick et al., 2001). Kürzlich wurde die Bindung von PXR/RXR an ein *response element* vom ER8 Typ in der 5'-flankierenden Sequenz des *multidrug resistance-associated protein 2* gezeigt (Kast et al., 2002).

1.3.5 Rolle von PXR als Xenobiotikasensor und Gallensäuresensor

Die zentrale Rolle des Pregnan-X-Rezeptors bei der Regulation des Fremdstoffmetabolismus wird vor allem durch die große Zahl der durch PXR regulierten Gene aller drei Phasen des Fremdstoffmetabolismus deutlich. Selektive PXR-Liganden stimulieren in der Leber die Expression von Genen, die an den Oxidations- und Funktionalisierungsreaktionen der Phase I, den Konjugationsreaktionen der Phase II und den Transportprozessen der Phase III des Xenobiotikametabolismus beteiligt sind. Von den Phase I Enzymen werden neben der Subfamilie *CYP3A* auch die Monooxygenasen *CYP2B6*, *CYP2C8*, *CYP2C9* und *CYP2C19* reguliert (Xie et al., 2000b; Gerbal-Chaloin et al., 2001; Goodwin et al., 2001; Synold et al., 2001; Gerbal-Chaloin et al., 2002). Die Beteiligung von PXR an der Regulation von Phase II Enzymen wurde bisher nur in Nagern bewiesen, hier werden Mitglieder der Glutathion-S-Transferasen (Falkner et al., 2001), der Sulfotferasen (Liu et al., 1996; Dunn et al., 1999; Runge-Morris et al., 1999), der UDP-Glucuronosyltransferasen (Madhu et al., 1991) und der Carboxylesterasenfamilien (Hosokawa et al., 1993) reguliert. Von den Transportern werden *Oatp2* in der Maus (Staudinger, J. L. et al., 2001b) und *MRP2* (Courtois et al., 1999; Fromm et al., 2000; Dussault et al., 2001) reguliert. Im Darm wurde außerdem die Beteiligung von PXR an der Regulation des *multidrug-resistance protein 1* (*MDR1*) gezeigt (Geick et al., 2001; Synold et al., 2001).

Neben seiner Sensorfunktion im Xenobiotikastoffwechsel wird dem Pregnan-X-Rezeptor auch im Zusammenhang der Regulation der Gallensäuresynthese und des Gallensäurestoffwechsels eine protektive bzw. homöostatische Funktion zugeschrieben, da einige Gallensäuren bzw. Gallensäuremetabolite Aktivatoren des PXR sind. Die in der Leber synthetisierten Gallensäuren sind für die Ausscheidung überschüssigen Cholesterins aus dem Körper und die Aufnahme und den

Transport von Lipiden der Nahrung in den Darm essentiell. Gleichzeitig können sie aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften als Detergentien bei supraphysiologischen Spiegeln extrem toxische Wirkungen haben. Die Homöostase der Gallensäuren muss daher genau reguliert werden.

Es ist seit langem bekannt, dass die Behandlung von Nagern mit PCN zu einer starken Verminderung der Cyp7a1 Aktivität (Einarsson et al., 1973) und mRNA Expression führt (Einarsson et al., 1973; Li, Y. C. et al., 1990). CYP7A1 katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Gallensäuresynthese aus Cholesterin. Da in PXR *knock out*-Mäusen die basale Cyp7a1 Expression um ungefähr 50% vermindert ist und eine verringerte Cyp7a1 Expression durch PCN-Behandlung in diesen Mäusen nicht auftritt (Staudinger, J. L. et al., 2001b), liegt die Beteiligung von PXR an der Regulation der Gallensäurehomöostase nahe, zumal viele der von PXR kontrollierten Gene neben ihrer Funktion im Fremdstoffmetabolismus auch am Gallensäurenmetabolismus und -transport beteiligt sind. So werden zum Beispiel Gallensäuren durch CYP3A4 hydroxyliert und durch MRP2 und OATP2 durch die hepatischen kanalikulären und sinusoidalen Membranen transportiert.

Mittels Reporterassays und *scintillation proximity binding assays* wurde gezeigt, dass sowohl die sekundäre Gallensäure Lithocholsäure (LCA), die im Intestinum durch bakterielle 7 α -Hydroxylierung aus Chenodesoxycholsäure entsteht, als auch ihr durch CYP3A4 gebildeter Metabolit 3-Ketolithocholsäure starke Aktivatoren des PXR der Maus und des Menschen sind (Staudinger, J. L. et al., 2001b; Xie et al., 2001). Folgerichtig führt die Behandlung mit LCA zu einer Induktion der PXR Zielgene *Cyp3a11* und *Oatp2* in der Leber von PXR-Wildtyp-Mäusen, nicht aber von PXR *knock out*-Mäusen (Staudinger, J. L. et al., 2001b).

1.3.6 Rolle von PXR bei der Entstehung von unerwünschten Arzneimittelinteraktionen

Aufgrund seiner zentralen Rolle als Regulator einer Vielzahl von Proteinen der Biotransformation und seiner Eigenschaft, strukturell sehr vielfältige Verbindungen als agonistische Liganden zu binden, kann der Pregnan-X-Rezeptor ursächlich an einer Reihe von unerwünschten Arzneimittelinteraktionen beteiligt sein. Als Beispiel seien hier die durch PXR vermittelte Induktion des CYP3A4 durch Bestandteile des Johanniskrauts und dadurch hervorgerufenen Interaktionen beschrieben.

Johanniskrautpräparate aus *Hypericum perforatum*, welche als verbreitete, sanfte pflanzliche Antidepressiva rezeptfrei erhältlich sind, induzieren die Expression von CYP3A4 im Darm (Durr et al., 2000), was einem beschleunigten Metabolismus einer Reihe von wichtigen Wirkstoffen führt, die CYP3A4 Substrate sind, wie orale Kontrazeptiva, das Immunsuppressivum Cyclosporin, der HIV Proteaseinhibitor Indinavir, das Antikoagulans Warfarin und das Kardiakum Digoxin (Ernst et al., 1998; Ernst, 1999; Johne et al., 1999; Breidenbach et al., 2000; Ruschitzka et al., 2000). Extrakte aus kommerziell erhältlichen Johanniskrautpräparaten führen zu einer Aktivierung von PXR in Reporterassays (Moore et al., 2000a; Wentworth et al., 2000). Die Untersuchung der chemischen Bestandteile von Johanniskrautpräparaten zeigte, dass diese Aktivierung fast ausschließlich durch die

Verbindung Hyperforin bewirkt wird (Moore et al., 2000a; Wentworth et al., 2000), welche gleichzeitig das für die antidepressive Wirkung des Johanniskrauts verantwortliche Agens ist (Laakmann et al., 1998), und PXR somit das vermutliche pharmakologische Target. In primären Hepatocyten führt die Behandlung mit Hyperforin zu einer Induktion der CYP3A4 Expression (Moore et al., 2000a). Aufgrund seiner regulatorischen Funktion und des breiten Ligandenspektrums des PXR ist also davon auszugehen, dass PXR-Agonisten natürlicher wie auch synthetischer Herkunft durch die Beeinflussung der Genexpression mehrerer Proteine des Biotransformationssystems den Transport und Metabolismus von Substraten der beeinflusst und so Wechselwirkungen verschiedener Intensität und Wichtigkeit hervorrufen können.

1.3.7 Polymorphismen im menschlichen PXR Gen

Es sind bisher ungefähr 40 *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) im PXR Gen des Menschen beschrieben. Sieben dieser SNPs sind *missense* Mutationen und führen zu PXR Proteinvarianten. Sie wurden sowohl in kaukasischen, als auch in afroamerikanischen und afrikanischen Populationen gefunden (Hustert et al., 2001b; Zhang, J. et al., 2001). Vier dieser *missense* Mutationen (R122Q, V140M, D163G, A370T) führen zu einer Veränderung der basalen und/oder rifampicininduzierten transkriptionellen Aktivierung in Reporterassays (Hustert et al., 2001b; Zhang, J. et al., 2001). Die drei *missense* Mutationen V140M, D163G und A370T sind in der Ligandenbindungsdomäne lokalisiert, es ist jedoch bei keiner der Varianten eine Aminosäure betroffen, die an der Bildung der Ligandenbindungstasche beteiligt ist. Die Varianten A370T und V140M zeigen leicht erhöhte, die Variante D163G beinahe komplett fehlende Basalaktivität. Die Allelfrequenz jeder dieser vier *missense* Polymorphismen liegt jedoch unter 2%. Es scheint daher eher unwahrscheinlich, dass diese Polymorphismen einen wesentlichen Faktor für den interindividuell sehr variablen Fremdstoffmetabolismus darstellen. Drei Polymorphismen des PXR Gens, die als stumme Mutationen keinen Aminosäureaustausch nach sich ziehen, korrelieren mit einer veränderten Expression des CYP3A4 Gens (Zhang, J. et al., 2001).

1.3.8 PXR *knock out*- und transgene Mäuse

Bei Mäusen, die kein funktionelles PXR Gen besitzen, ist kein offensichtlicher Phänotyp zu erkennen. Sie zeigen eine normale Entwicklung und sind fortpflanzungsfähig (Xie et al., 2000a; Staudinger, J. L. et al., 2001b), so dass eine entwicklungsbiologisch essentielle Rolle von PXR nicht gegeben scheint. Dennoch zeigten Expressionsanalysen, dass in den PXR *knock out*-Mäusen einige P450 Monooxygenasen, konjugierende Enzyme der Phase II des Fremdstoffmetabolismus, sowie Transporterproteine nicht exprimiert werden (Xie et al., 2000b; Staudinger, J. L. et al., 2001b; Maglich et al., 2002). Damit übereinstimmend ist ein verändertes Ansprechen der PXR *knock out*-Mäuse auf Behandlung mit Pharmaka beobachtet worden. Während PCN in Wildtyp-Mäusen durch eine

Induktion zellulärer Hypertrophie und Hyperplasie eine Hepatomegalie erzeugt, war dieser Effekt in *knock out*-Mäusen nicht zu beobachten (Staudinger, J. et al., 2001a). Ebenso konnte durch die Gabe von PCN oder Dexamethason keine Induktion von *Cyp3A11* (Xie et al., 2000a; Staudinger, J. L. et al., 2001b) erzeugt werden.

Dagegen sind Mäuse, die das ligandenunabhängig konstitutiv aktive, humane PXR Protein VP16-hPXR exprimieren, resistent gegenüber einer durch Zoxazol induzierten Lähmung und können durch Gabe von Tribromethanol nicht anaesthetisiert werden (Xie et al., 2000a; Staudinger, J. L. et al., 2001b). Gleichzeitig zeigen diese Tiere jedoch ein retardiertes Wachstum, Hepatomegalie und Symptome einer Lebervergiftung (Xie et al., 2000a).

In Experimenten mit transgenen PXR *knock out*-Mäusen, die in ihrer Leber humanes PXR exprimieren, wurde ein Verlust der Induzierbarkeit des *Cyp3A11* durch mausspezifische Induktoren beobachtet, stattdessen konnte *Cyp3A11* durch den für den Menschen spezifischen CYP3A Induktor Rifampicin induziert werden (Xie et al., 2000a). Die speziesspezifischen Ligandenspektren (Jones et al., 2000) und die speziesspezifischen Geninduktionsspektren sind also vermutlich auf die charakteristischen Liganden- und DNA-Bindungseigenschaften des Pregnan-X-Rezeptors der jeweiligen Spezies zurückzuführen.

1.4 Hepatocyte Nuclear Factor 4 α

Der *Hepatocyte Nuclear Factor 4 α* (HNF4 α , NR2A1) gehört zur Gruppe A der Subfamilie 2 der Kernrezeptoren, zu der außer HNF4 α noch der bisher nur in *Xenopus* gefundene Kernrezeptor HNF4 β , sowie HNF4 γ und die nur in Insekten vorkommenden dHNF4, BmHNF4 und AaHNF4 gehören. HNF4 α ist an der Regulation einer Vielzahl hepatisch exprimierter Gene beteiligt, unter denen sich sowohl Serumproteine wie die Apolipoproteine A1, AII, B und CIII, die Gerinnungsfaktoren Faktor VI und Faktor IX, oder α 1-Microglobulin, α 1-Antitrypsin, Serinproteaseinhibitoren und Angiotensinogen befinden, aber auch metabolische Enzyme des Fettsäurestoffwechsels, des Aminosäurestoffwechsels (Tyrosinaminotransferase) und des Glucosemetabolismus (Pyruvatkinase, Phosphoenolpyruvatcarboxykinase), sowie andere Transkriptionsfaktoren wie *Hepatocyte Nuclear Factor 1* (HNF1) oder 6 (HNF6) (Sladek, 1994).

Die transkriptionelle Regulation durch HNF4 erfolgt durch dessen Bindung als Homodimer (Jiang et al., 1995) an divergente REs vom DR1 Typ, wie zum Beispiel in den Promotoren von HNF1 (Tian et al., 1991) und der Apolipoproteine B, AII oder CIII (Ladiaz et al., 1992; Metzger et al., 1993). HNF4 α fungiert im allgemeinen als konstitutiver transkriptioneller Aktivator, dessen DNA Bindungsaktivität durch Phosphorylierung an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten moduliert werden kann (Ktistaki et al., 1995).

Bis vor kurzem wurde HNF4 α den sogenannten Waisenrezeptoren zugeordnet. Inzwischen wurden jedoch langkettige Fettsäuren als Liganden des HNF4 α vorgeschlagen, welche als Acyl-CoA

Thioester an die LBD von HNF4 α binden und die transkriptionelle Aktivität geringfügig modulieren (Hertz et al., 1998). Dabei inhibieren Acyl-CoA Thioester einfach oder mehrfach ungesättigter Fettsäuren die konstitutive Aktivität von HNF4 α , während Palmitoyl-CoA-Ester und Steroyl-CoA-Ester aktivierend oder inhibierend wirken.

Das HNF4 α Gen des Menschen liegt auf Chromosom 20 bei Position q12-q13.1 (Drewes et al., 1996; Yamagata et al., 1996). HNF4 α wird im Menschen hauptsächlich in der Leber, im Darm und in der Niere exprimiert, seine Transkription wird durch die HNF3 Familie (Duncan et al., 1998), HNF6 und HNF1 β reguliert (Morrisey et al., 1998; Coffinier et al., 1999). Durch alternatives Spleißen werden verschiedene Transkript- und Proteinisoformen gebildet. Die verschiedenen Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Transaktivierungspotentiale und ihrer Interaktion mit Co-Aktivatoren. Für die Isoform HNF4 α 1 wurde die physikalische und funktionelle Interaktion mit den Co-Aktivatoren GRIP1, SRC1, P300 und CBP in Abwesenheit von exogenen Liganden gezeigt (Wang, J. C. et al., 1998). Interessanterweise kann die F-Domäne von HNF4 α eine von der AF2 unabhängige Bindungsstelle für den Co-Aktivator GRIP1 maskieren und stellt somit eine Art transkriptionell inhibitorische Domäne dar (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997; Iyemere et al., 1998). Bei den HNF4 α 2 und HNF4 α 5 Isoformen, die beide in der Mitte der F-Domäne eine Insertion von 10 Aminosäuren tragen, ist diese Inhibition der Co-Aktivatorbindung aufgehoben bzw. die Interaktion mit dem Co-Aktivator verstärkt (Sladek et al., 1999).

Mäuse ohne funktionelles HNF4 α Gen sterben in einem sehr frühen Stadium der Embryogenese, da sie aufgrund einer Dysfunktion des visceralen Endoderms die Gastrulation nicht vollenden können. Durch Komplementation der HNF4 α ^{-/-} Embryos mit einem visceralen Endoderm aus einem tetraploiden Wildtypembyro kann der frühe Entwicklungsarrest allerdings überbrückt werden. In der Leber solchermaßen geretteter HNF4 α ^{-/-} Mäuse wird jedoch eine ganze Reihe leberspezifischer, für die Funktion des Hepatocyten essentieller Proteine nicht exprimiert. Darüber hinaus findet keine Expression des Pregnan-X-Rezeptors mehr statt (Li, J. et al., 2000).

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte

- anhand umfangreicher Gewebebanken humanen Leber- und Darmgewebes die Variabilität der Cytochrom P450 3A4 Expression sowohl auf der Ebene des Proteins als auch auf der Ebene der mRNA untersucht werden. Desweiteren sollte auch die Expression des Pregnan-X-Rezeptors bestimmt werden, um dessen Variabilität in einem großen Kollektiv zum ersten Mal zu untersuchen und um mögliche Zusammenhänge zwischen der Expression dieses zentralen regulatorischen Faktors der Biotransformation und seines Zielgens CYP3A4, einem der wichtigsten fremdstoffmetabolisierenden Enzyme, zu untersuchen.
- durch die Bestimmung der Expression des Pregnan-X-Rezeptors und der von ihm regulierten Gene CYP3A4 und MDR1 anhand von humanem Duodenalbiopsiegewebe aus einer Rifampicin-Digoxin-Interaktionsstudie überprüft werden, ob die individuelle Stärke der PXR Expression ein determinierender Faktor für die Induzierbarkeit oder das Ausmaß der Induktion der PXR-Zielgene CYP3A4 und MDR1 ist.
- durch eine Analyse der 5'-flankierenden Region des PXR Gens die transkriptionelle Regulation der Expression des Pregnan-X-Rezeptors untersucht werden. Hierzu sollte eine Bibliothek von unidirektional verkürzten Promotor-Reportergen-Konstrukten generiert werden und durch die Transfektion dieser Konstrukte in geeignete Zelllinien sollten funktionelle Sequenzbereiche (*cis-acting* Elemente) in der 5' flankierenden Region des PXR Gens und Kernrezeptoren und Transkriptionsfaktoren (*trans-acting* factors), die einen Einfluss auf die Promotoraktivität der Promotor-Reportergen-Konstrukte ausüben, identifiziert werden. Hierbei sollten vorrangig Faktoren untersucht werden, für deren Beteiligung am Regulationsgeschehen bereits Hinweise vorlagen, d.h. der *Hepatocyte Nuclear Factor 4 α* , der Glucocorticoidrezeptor und der Pregnan-X-Rezeptor selbst.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems
AutoLumat <i>Plus</i>	Berthold Technologies
BAS-1800 II Image Reader	Fuji
BAS-MS 2325 Imaging Plates	Fuji
Biofuge 13	Heraeus
Eppendorf Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf
Elektrophoresekammern für Western Blot	BioRad
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Owl Separation Systems
Gel Dryer Model 583	Bio-Rad
GeneQuant Photometer	Amersham Pharmacia
Hettich Rotanta/S	Hettich
Hettich Universal 32	Hettich
LI-COR DNA Sequencer Model 4000	MWG Biotech
Luminescent Image Analyzer LAS-1000	Raytest / Fuji
Omn-E Thermal Cycler	Hybaid Ltd.
Sorvall RC2B	Sorvall
Trans Blot SD® Semi-Dry Transfer Cell	BioRad
VICTOR™ 1420 Multilabel Counter	Wallac

2.1.2 Kits und Verbrauchsmaterialien

2.1.2.1 Kits

Effectene™ Transfection Reagent	QIAGEN
Exo Mung Bean Deletion Kit	Stratagene
E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit II	PEQLAB Biotechnologie
GeneRacer™ Kit	Invitrogen
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAGEN PCR Purification Kit	QIAGEN
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
RNeasy Mini Kit	QIAGEN
RNeasy Midi Kit	QIAGEN
RNase-free DNase Set	QIAGEN

SequiTherm EXCEL™ II DNA Sequencing Kit	Epicentre Technologies
SuperSignal WestDura Extended Duration Chemilumineszenz System	Pierce
TaqMan® Reverse Transcription Reagents Kit	Applied Biosystems / Roche
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham Pharmacia Biotech
ThermoZyme™ DNA Polymerase	Invitrogen
TNT Quick Coupled Transcription/Translation System	Promega
TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing	Invitrogen

2.1.2.2 Verbrauchsmaterial

[α - ³² P] dCTP	ICN Biomedicals
2× Tris-Glycin SDS Probenpuffer	Invitrogen
2× Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
5× Passive Lysis Buffer	Promega
30% (w/v) Acrylamid-/Methylenbisacrylamid (37,5:1)	BioRad
Bacto-Agar	DIFCO
Chill-out 14™ Liquid Wax	MJ Research Inc.
Dexamethason	Sigma
Dextran T70	Pharmacia
DNA Größenmarker	Invitrogen/GIBCO BRL
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (25 mM HEPES, w/o Na-Pyruvat, w/ 4500 mg Glucose/l, w/ Pyridoxin)	Invitrogen/GIBCO BRL
Dulbecco´s Modified Eagle Medium ohne Phenolrot	Invitrogen/GIBCO BRL
Emerald™ 10 mg/ml	Tropix, Bedford, MA, USA
Foetales Kälberserum	Biochrom KG, Berlin
Foetales Kälberserum	Invitrogen/GIBCO BRL
Galacton™ 100×	Tropix, Bedford, MA, USA
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
L-Glutamin 200 mM	Biochrom KG, Berlin
MicroSpin™ G-25 Columns	Amersham Pharmacia
Minimum Essential Medium w/ Earle´s Salts	Invitrogen/GIBCO BRL
MULTIWELL™ 24well Platten	BD Biosciences / Falcon
Natriumpyruvat MEM 100 mM	Invitrogen/GIBCO BRL
Nicht-essentielle Aminosäuren 100×	Biochrom KG, Berlin
Norit A Aktivkohle	Serva

Oligo(dT)-Cellulose Type 7	Amersham Pharmacia
Oligonucleotidprimer	MWG
One Shot® TOP10F' Competent Cells	Invitrogen
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml – 10000 µg/ml)	Invitrogen/GIBCO BRL
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma
ProbeQuant™ G-50 Micro Columns	Amersham Biosciences
PVDF Membranen	Roche
Restriktionsenzyme und –puffer	New England Biolabs
	Roche
	Stratagene
Rifampicin	Merck
RNAlater™	Ambion, Austin, TX, USA
T4 DNA Ligase	Roche
Trypsin-EDTA 1× (0,25% Trypsin, 1mM EDTA×4 Na)	Invitrogen/GIBCO BRL
Trypton Pepton	DIFCO

2.1.3 Software

2.1.3.1 Lokale Softwareapplikationen

AIDA Version 2.0	Raytest
GraphPad Prism V3.0	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Base ImagIR Image Analysis	LI-COR, Lincoln, NE, USA
LASERGENE Sequence Analysis Software	DNASar Inc., Madison, WI, USA
Primer Express™ 1.5	Applied Biosystems
Sequence Detection Software V1.7	Applied Biosystems

2.1.3.2 Online-Datenbanken und -Applikationen

http://www.ncbi.nlm.nih.gov	Datenbanken des <i>National Center for Biotechnology Information</i> (NCBI)
http://www.genomatix.de	MatInspector Analyseprogramm für Transkriptionsfaktor- bindungsstellen
http://www.nubiscan.unibas.ch	Programm zur Vorhersage von Kernrezeptorbindungsstellen
http://www.alibaba2.com	Programm zur Vorhersage von Transkriptionsfaktor- bindungsstellen

2.1.4 Puffer und Lösungen

2.1.4.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

1× PBS

137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄

10× T4 PNK Puffer

700 mM Tris-Cl pH 7,6; 100 mM MgCl₂; 50 mM DTT

10× TBE

900 mM Tris-Borat pH 8,3; 20 mM EDTA pH 8,0

1 M Na-Phosphatpuffer pH 7,0

57,7 ml 1 M Na₂HPO₄ + 42,3 ml 1M NaH₂PO₄

2.1.4.2 Puffer und Lösungen für DNA- und RNA-Analytik

50× TAE

2 M Tris-Acetat, 50 mM EDTA

DNA Probenpuffer

90 mM Tris-Borat pH 8,3; 12% (w/v) Ficoll; 0,1% (w/v) Bromphenolblau; 0,1% (w/v) Xylencyanol

10× MOPS

200 mM MOPS; 50 mM NaAcetat pH 7,0; 10 mM EDTA

10× RNA-Elektrophoresepuffer

200 mM MOPS; 50 mM NaAcetat pH 7,0; 10 mM EDTA; 0,1% (v/v) DEPC

RNA Probenpuffer für RNA-Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese

20 mM MOPS pH 7,0; 5 mM NaAcetat; 1 mM EDTA; 50% Formamid deion.; 6,6% (v/v) Formaldehyd; 0,1% (v/v) DEPC

Herstellung: 10 µl 10× MOPS; 500 µl Formamid deion.; 178 µl 37% Formaldehyd; 222 µl H₂O (0,1% DEPC)

RNA Formaldehyd-Agarosegel

1% (w/v) Agarose; 20 mM MOPS; 5 mM Na Acetat pH 7,0; 1 mM EDTA; 6,6% (v/v) Formaldehyd; 0,1% DEPC

Herstellung: Zugabe von 37%igem Formaldehyd nach Aufkochen der Agarose ab ~60°C

2.1.4.3 Puffer und Lösungen für Proteinanalytik

2.1.4.3.1 *Puffer und Lösungen für Aufarbeitung von Lebergewebe*

Homogenisierungspuffer

10 mM HEPES pH 7,4; 150 mM KCl; 1 mM EDTA pH 8,0; 1 mM DTT; 0,2 mM Pefa-Bloc

Mikrosomenwaschpuffer

100 mM Na-Pyrophosphat pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0

Mikrosomenpuffer

100 mM Na-Phosphat pH 7,4

2.1.4.3.2 *Puffer und Lösungen für Western Blotting*

10× Elektrophoresepuffer

250 mM Tris; 1,9 M Glycin; 1% (w/v) SDS

Transferpuffer

50 mM Tris; 40 mM Glycin; 0,037% (w/v) SDS; 20% (v/v) Methanol

TBS-T (Tris-buffered saline/Tween)

25 mM Tris-HCl pH 7,4; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,1% Tween-20

Blockingpuffer

25 mM Tris-HCl pH 7,4; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,1% Tween-20; 5% (w/v) Magermilchpulver

Polyacrylamidtrenngel

375 mM Tris-Cl pH 8,8; 10% (w/v) Acrylamid; 0,266% (w/v) Methylenebisacrylamid; 0,1% (v/v) TEMED; 0,1% (w/v) SDS

Starten der Polymerisation durch Einstellen auf 0,1% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

Polyacrylamidsammelnegel

125 mM Tris-Cl pH 6,8; 4% (w/v) Acrylamid; 0,1066% (w/v) Methylenebisacrylamid; 0,1% (v/v) TEMED; 0,1% (w/v) SDS

Starten der Polymerisation durch Einstellen auf 0,1% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

2.1.4.4 Puffer und Lösungen für PolyA⁺ RNA Isolierung

2.1.4.4.1 Stammlösungen

1 M Tris-Cl pH 7,2; 0,1% (v/v) DEPC

Herstellung: Tris in bereits DEPC-behandeltes und autoklaviertes Wasser geben;
pH einstellen; nochmals autoklavieren

0,5 M EDTA pH 8,0; 0,1% (v/v) DEPC

20% (w/v) SDS

3 M NaAcetat pH 5,2; 0,1% (v/v) DEPC

2.1.4.4.2 Gebrauchslösungen

Gebrauchslösungen wurden in autoklavierten, leeren Flaschen angesetzt und nochmals autoklaviert

Zellsuspensionspuffer

10 mM Tris-Cl pH 7,2; 500 mM NaCl; 10 mM EDTA pH 8,0; 0,1% (v/v) DEPC

Bindungspuffer

10 mM Tris-Cl pH 7,2; 500 mM NaCl; 10 mM EDTA pH 8,0; 0,2% (w/v) SDS; 0,1% (v/v) DEPC

Waschpuffer

10 mM Tris-Cl pH 7,2; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,1% (v/v) DEPC

Elutionspuffer

10 mM Tris-Cl pH 7,2; 0,1 mM EDTA pH 8,0; 0,1% (v/v) DEPC

2.1.4.5 Puffer und Lösungen für CTAB Plasmidisolierung

STET Puffer (sterilfiltriert)

8% (w/v) Saccharose; 50 mM Tris-Cl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 0,1% Triton X-100

Herstellung: 20 ml 20% (w/v) Saccharose; 5 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; 5 ml 5 M Tris-Cl pH 8,0; 500 µl
10% (v/v) Triton X-100; 20 ml H₂O

CTAB Lösung

500 mM NaCl; 0,5% (w/v) CTAB

2.1.4.6 Puffer und Lösungen für Primer Extension

10× Hybridisierungspuffer

0,1 M Tris-Cl pH 8,3; 1,5 M KCl; 10 mM EDTA pH 8,0

RNase Reaktionsmix

20 µg/ml RNase A (DNase-frei, gelöst in TEN100); 100 mg/ml Fischsperma DNA

2.1.4.7 Puffer und Lösungen für Reporterassays

β-Galactosidase Assaypuffer

100 mM Na-Phosphat pH 8,0; 1 mM MgCl₂; 1,25 µg/ml Galacton

β-Galactosidase Stopplösung

200 mM NaOH; 0,25% (v/v) Emerald™

Reaktions-Injektions-Mix+ (RIM+)

25 mM Glycylglycin pH 7,8; 0,5 mM Luciferin; 2 mM ATP; 10 mM MgCl₂; 27 µM Coenzym A; 30 mM DTT

2.1.4.8 Puffer für Electrophoretic Mobility Shift Assays

10× Klenow Puffer

500 mM Tris-Cl pH 7,5; 500 mM NaCl; 100 mM MgCl₂

TEN100

10 mM Tris-Cl pH 7,8; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl

TEN300

10 mM Tris-Cl pH 7,8; 1 mM EDTA; 300 mM NaCl

Kernextraktionsniedrigsalzpuffer

10 mM HEPES pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 0,5 mM PMSF; 1 mM DTT

Kernextraktionshochsalzpuffer

20 mM HEPES pH 7,9; 0,42 M NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM PMSF; 1 mM DTT

2× Bindungspuffer

20 mM HEPES pH 7,9; 120 mM KCl; 4 mM DTT; 0,4% (v/v) Nonidet-P40; 12% (v/v) Glycerin

2.1.4.9 Medien für Kultur von *Escherichia coli*

Luria-Bertani Flüssigmedium

1% (w/v) Trypton Pepton; 1% (w/v) NaCl; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 100 µg/ml Ampicillin
pH 7,0 mit 5 M NaOH einstellen, Autoklavieren, Antibiotikum nach Abkühlen auf 50°C zugeben.

Luria-Bertani Agarmedium

1% (w/v) Trypton Pepton; 1% (w/v) NaCl; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1,5% (w/v) Bacto-Agar; 100 µg/ml Ampicillin
pH 7,0 mit 5 M NaOH einstellen, Autoklavieren, Antibiotikum nach Abkühlen auf 50°C zugeben.

2.1.4.10 Medien für Kultur von Säugerzellen

Kulturmedium für LS174T Zellen

86% (v/v) D-MEM; 10% (v/v) FCS; 2 mM L-Glutamin; 1 mM Natriumpyruvat; 1× Nichtessentielle Aminosäuren; 100 Einheiten/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin

Kulturmedium für COS-1 und HeLa Zellen

88% (v/v) D-MEM; 10% (v/v) FCS; 2 mM L-Glutamin; 100 Einheiten/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin

Kulturmedium für HepG2 Zellen

88% (v/v) MEM; 10% (v/v) FCS; 2 mM L-Glutamin; 100 Einheiten/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin

Kryokonservierungsmedium

40% (v/v) Kulturkomplettmedium; 40% (v/v) FCS; 20% (v/v) DMSO

2.1.5 Antikörper und rekombinante Proteine

Polyklonaler Ziege anti-HNF4α Antikörper

HNF4α (C-19) X, sc-6556X, Lot# D242

Santa Cruz Biotechnology

Polyklonaler Kaninchen anti-CYP3A4 Antikörper

WB3A4 (A-234)

GENTEST / NatuTec

Peroxidase-konjugierter Ziege anti-Kaninchen

IgG F(ab')₂ Fragment-spezifisch

Dianova

Human Lymphoblast-Expressed CYP3A4

GENTEST /Natutec

2.1.6 Plasmide

Tabelle 2. Für transiente Transfektionen oder quantitative RT-PCR verwendete Plasmide.

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft/ Referenz
pUVI/3A4	CYP3A4 vollständiger ORF	(Buters et al., 1994)
pMDR V1 5´	MDR1 5´ partieller ORF	(Choi et al., 1988)
pUC18		
pCMV β	Expressionsvektor für β -Galactosidase	Clontech
pcDNA3	Expressionsvektor für Säugerzellen	Invitrogen
pcDhuHNF4 α 1	Expressionsvektor für humanes HNF4 α 1	O.Burk
pcDhuCOUP-TFI	Expressionsvektor für humanes COUP-TFI	O.Burk
pcDhuCOUP-TFII	Expressionsvektor für humanes COUP-TFII	O.Burk
pcDhuGR α	Expressionsvektor für humanen GR α	O.Burk
pcDhuPXR	Expressionsvektor für humanes PXR	(Geick et al., 2001)
pGL3-Basic	Luciferase-Reportergenvektor ohne Promotor/Enhancer	Promega
pGL3-PXR(-2543)	Reportergenvektor mit PXR 5´ flankierende Region von -2543 bis +195	
pGL3-PXR(-2406)	5´ flankierende Region von -2406 bis +195	
pGL3-PXR(-1705)	5´ flankierende Region von -1705 bis +195	
pGL3-PXR(-1486)	5´ flankierende Region von -1486 bis +195	
pGL3-PXR(-1097)	5´ flankierende Region von -1097 bis +195	
pGL3-PXR(-805)	5´ flankierende Region von -805 bis +195	
pGL3-PXR(-560)	5´ flankierende Region von -560 bis +195	
pGL3-PXR(-479)	5´ flankierende Region von -479 bis +195	
pGL3-PXR(-300)	5´ flankierende Region von -300 bis +195	
pGL3-PXR(-191)	5´ flankierende Region von -191 bis +195	
pGL3-PXR(-161)	5´ flankierende Region von -161 bis +195	
pGL3-PXR(-129)	5´ flankierende Region von -129 bis +195	
pGL3-PXR(-71)	5´ flankierende Region von -71 bis +195	
pGL3-PXR(-20)	5´ flankierende Region von -20 bis +195	
pGL3-PXR(+26)	5´ flankierende Region von +26 bis +195	
pGL3-PXR(-191/ -96T>A;-95T>A)	5´ flankierende Region von -191 bis +195 Nucleotidaustausche bei -96 und -95	
pGL3-PXR(-191/ -84A>T;-83C>T;-77A>T;-76C>T)	5´ flankierende Region von -191 bis +195 Nucleotidaustausche bei -84,-83,-77,-76	
pGL3-TK(-105)	Reportergenvektor mit Thymidinkinase 5´ flankierende Region von -105 bis +51	(Geick et al., 2001)
pGL3-bisHNF4 α -RE-TK(-105)	mit HNF4 α -RE Dimer	
pGL3-pentakishNF4 α -RE-TK(-105)	mit HNF4 α -RE Pentamer	
pGL3-tetrakisGREcons-TK(-105)	mit GR α -RE Tetramer	
pGL3-CYP3A4(-7830/ Δ 7208-364)	Reportergenvektor mit CYP3A4 5´ flankierende Region von -7830 bis +51 Bereich -7208 bis -364 deletiert	(Hustert et al., 2001b)

2.1.7 Gewebeproben aus klinischen Studien

Für die Untersuchung der Expression von mRNA und Protein wurden Gewebeproben verwendet die im Rahmen von klinischen Studien gesammelt wurden waren.

2.1.7.1 Gewebe aus der Lebergewebestudie IKP148

Seit Mitte 1999 wird am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart im Rahmen einer Studie (Studiencode IKP148) eine Gewebestudie mit menschlichen Leberproben aufgebaut. Die Studie war durch die Ethikkomitees der Medizinischen Fakultäten der Charité, Humboldt-Universität Berlin, und der Universität Tübingen genehmigt, und wurde gemäß den Bestimmungen der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Nach Aufklärung des Patienten und Erhalt der schriftlichen Einverständniserklärung wurde Patienten, die sich einem chirurgischen Lebereingriff unterziehen mussten, im Rahmen der Operation ein kleines Stück normales Lebergewebe entnommen. Die Abwesenheit von Tumormaterial wurde durch eine histologische Analyse überprüft.

Mittels eines Fragebogens und klinischer Daten wurden ethnische Zugehörigkeit, Alter, Geschlecht, die zur Operation führende Diagnose, Art der Operation, frühere Diagnosen, eventuelle regelmäßige Medikamenteneinnahme vor der Operation, Raucherstatus (Nichtraucher, <1 Schachtel pro Tag, >1 Schachtel pro Tag), Alkoholkonsum (keiner, wöchentlich, täglich, Mißbrauch) und Ernährungsgewohnheiten (Kaffee, Tee, vegetarische Kost, salzarme Kost, fettarme Kost) ermittelt.

Patienten mit schweren Leberkrankheiten (virale Hepatitis, Cirrhose) oder Alkoholabusus wurden von der Analyse ausgeschlossen. Es wurden die Gewebeproben von 94 Patienten, 48 Männer und 46 Frauen kaukasischer Abstammung, in die Analyse einbezogen (Tabelle 16). Patienten, die vor der Operation nicht regelmäßig Medikamente außer gegebenenfalls Heparin und Vitamin C-Präparaten einnahmen wurden der Kontrollgruppe zugeordnet. Diese Kontrollgruppe setzte sich aus 23 Männern und 16 Frauen zusammen. Das Gewebe wurde bei -80°C gelagert. Für die Isolierung von RNA wurden ungefähr 0,1 g Gewebe in *RNAlater*TM gemäß den Empfehlungen des Herstellers gelagert.

2.1.7.2 Gewebe aus der Leber- und Darmgewebestudie IKP113

In Zusammenarbeit mit dem Zentrum für operative Medizin des Robert Bosch Krankenhauses wurde am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie im Rahmen einer klinischen Studie (Studiencode IKP113) eine Sammlung von gepaarten Dünndarm- und Leberproben von jeweils demselben Patienten durchgeführt. In die von der Landesärztekammer Stuttgart genehmigte Studie waren Patienten, bei denen eine Duodenopankreatektomie (Operation nach Whipple) oder eine Magenresektion durchgeführt wurde, eingeschlossen. Nach Begutachtung des bei der Operation anfallenden Duodenalgewebes durch den Pathologen wurden die für die RNA-Analyse vorgesehenen Proben 24 h in *RNAlater*TM bei 4°C zwischengelagert. Nach 24 h wurde das Gewebe aus der Lösung genommen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

2.1.7.3 Gewebe aus der Rifampicin-Digoxin-Interaktionsstudie IKP112

Für die Untersuchung des Einflusses von Rifampicin auf die intestinale Expression von Cytochrom P450 3A4, MDR1 und PXR RNA wurde Darmbiopsiegewebe verwendet, welches im Rahmen der von Landesärztekammer Stuttgart genehmigten Rifampicin-Digoxin-Interaktionsstudie (Studiencode IKP112) gesammelt worden war (Greiner et al., 1999). In die Studie waren 8 gesunde, männliche Probanden eingeschlossen, die während der Studiendauer keine weiteren Medikamente einnahmen und kein Koffein und keinen Alkohol zu sich nahmen.

Zu Beginn der Studie wurden die Probanden am Tag 1 einer Oesophagogastroduodenoskopie unterzogen und Dünndarmmucosabiopsien entnommen. Im Verlauf der Studie nahmen die Probanden ab Tag 8 oral 600 mg Rifampicin einmal täglich bis Tag 23. Am Tag 17 wurde erneut eine Oesophagogastroduodenoskopie durchgeführt und weitere Dünndarmmucosabiopsien entnommen. Die Biopsien wurden nach Entnahme jeweils sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine DNA Methoden

2.2.1.1 Dephosphorylierung von Plasmiden mit Shrimp Alkalischer Phosphatase

Um bei Ligationsreaktionen eine Religation von mit nur einem Restriktionsenzym aufgeschnittenen Vektoren zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatreste der linearisierten Plasmide durch Verdau mit Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP) entfernt. Dafür wurde die geschnittenen Plasmid-DNA nach dem Restriktionsverdau direkt oder nach Auftrennung im und Extraktion aus dem Agarosegel mit 10× Dephosphorylierungspuffer eingestellt und 1 U Shrimp Alkalische Phosphatase pro 50 ng verdauter Plasmid-DNA zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37°C für Plasmide mit überhangenden Enden und 60 min Inkubation für Plasmide mit stumpfen Enden wurde die SAP durch 15 min Inkubation bei 65°C inaktiviert.

2.2.1.2 Transformation von TOP10F' *E. coli*

Zur Vermehrung von Plasmiden und zur Selektion erfolgreicher Ligationsreaktionen bei Klonierungen und Subklonierungen wurden selbst hergestellte oder kommerziell erhältliche TOP10F' *E. coli* Zellen (Invitrogen) verwendet. Die Transformation der Zellen mit DNA erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die TOP10F' Zellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend ein Volumen von maximal bis zu 1/10 des Bakterienlösungsvolumens eines Ligationsreaktionsansatzes bzw. 1 µl oder ~500 ng DNA Plasmidlösung zupipettiert und der Transformationsansatz durch vorsichtiges Rühren mit der Pipettenspitze gemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien für 30 bis 45 s im 42°C warmen Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt und dann sofort für 2 min wieder auf Eis

gestellt. Dann wurden 250 µl raumtemperiertes SOC Medium zugegeben und der Ansatz vor dem Ausplattieren bei 37°C und 220 Upm ungefähr 1 h im Schüttelinkubator inkubiert.

2.2.1.3 Selektion und Vermehrung von Transformanten und Rekombinanten

Zur Selektion von transformanten bzw. rekombinanten Bakterien wurde ein geeignetes (10-200 µl) Volumen eines Transformationsansatzes auf LB-Agar-Platten mit Ampicilin als Selektionsmarker ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag Klone mit sterilen Zahnstochern unter Beachtung möglicher Satellitenkolonien aufgenommen und in 2 ml ampicillinhaltigem LB-Medium als Mini-Kultur im Reagenzglas bei 37°C und 220 Upm im Schüttelinkubator vermehrt.

2.2.1.4 Isolierung von Plasmid DNA aus Mini-Kulturen

Plasmid-DNA aus Mini-Kulturen wurde mit der CTAB-Mini-Plasmid-DNA-Präparation (Del Sal et al., 1988) isoliert. Hierzu wurde die Kultur in ein Eppendorfgefäß überführt und die Zellen 30 s in der Eppendorf Tischzentrifuge 5417C bei 14000 Upm pelletiert. Nach Abnehmen des Kulturmediumüberstandes wurde das Bakterienpellet in 200 µl STET-Puffer durch Pipettieren resuspendiert und nach Zugabe von 10 µl Lysozymbelösung (20 mg/ml) durch Vortexen gemischt und anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Aufkochen für 45 s bei 95°C wurde 10 min abzentrifugiert und das entstandene Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Nach Zugabe von 10 µl CTAB-Lösung wurde gevortext und wiederum 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in 300 µl 1,2 M Natriumchloridlösung aufgelöst. Falls nötig wurde zum vollständigen Auflösen des Pellets stark gevortext und nach kurzem Erwärmen auf 60 bis 70°C kurz abzentrifugiert. Durch Zugabe von 750 µl Ethanol und Mischen durch kurzes Vortexen wurden die Nucleinsäuren präzipitiert und durch 10 min Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach 5 min Zentrifugation und Dekantieren des Überstandes wurde nochmals trocken zentrifugiert und nach Abnehmen von Flüssigkeitsresten mit der Pipette das Pellet 5 bis 15 min luftgetrocknet. Schließlich wurde das Pellet mit 25 µl TE Puffer gelöst.

2.2.1.5 Isolierung von Plasmid DNA für Transfektionsexperimente

Zur Gewinnung grösserer Plasmidmengen für Transfektionen wurden die transformierten und im SOC Medium angezogenen *E. coli* Zellen in 20 ml ampicillinhaltigem LB-Medium über Nacht bei 37°C und 220 Upm im Schüttelinkubator vermehrt. Anschließend wurde die Plasmid DNA mit dem E.Z.N.A Plasmid MiniPrep II Kit (PeqLab) gemäß einem geringfügig modifizierten Protokoll des Herstellers isoliert.

15 ml der Bakterienkultur wurden in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und 10 bis 20 min bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet durch Vortexen in 500 µl mit RNase A versetzter Lösung I resuspendiert. Die Suspension wurde in ein 2 ml Eppendorfgefäß

überführt und 500 µl Lösung II zupipettiert und die Lösung durch mehrmaliges Invertieren solange gemischt, bis ein klares Lysat entstand und anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 700 µl Lösung III wurden zum Lysat zugegeben und durch Invertieren gemischt bis sich ein flockiges, weißes Debris-Präzipitat gebildet hatte. Das Präzipitat wurde 10 min bei 10000 g pelletiert und der Überstand in Portionen zu je maximal 800 µl auf HiBind-Säulchen gegeben und jeweils 1 min bei 10000 g die Säulchen beladen. Dann wurden 500 µl HB-Puffer auf das Säulchen pipettiert und erneut 1 min bei 10000 g zentrifugiert. Anschließend wurden zweimal je 750 µl DNA-Waschpuffer auf die Säulchen pipettiert und durch 1 min Zentrifugation bei 10000 g gewaschen. Dann wurde einmal 1 min bei 20800 (Eppendorf Tischzentrifuge 5417C, 14000 Upm) trocken zentrifugiert, um eventuell verbliebene Ethanolreste zu entfernen. Schließlich wurden 50 µl TE Puffer direkt auf die Säulenmatrix pipettiert und nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur die Plasmid DNA durch 1 min Zentrifugation bei 10000 g eluiert. Dieser Elutionsschritt wurde anschließend einmal wiederholt.

2.2.1.6 Aufreinigung von DNA Fragmenten

2.2.1.6.1 *Agarosegelelektrophorese*

Zur Analyse und zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurden diese in Agarosegelen verschiedener Prozentigkeit elektrophoretisch getrennt. Eine entsprechende Agarosemasse wurde mit 1× TAE abgewogen und im Mikrowellenofen oder auf einer Heizplatte aufgeköcht bis keine Agaroseklümpchen mehr zu erkennen waren. Nach erneutem Wiegen wurde das verlorene Gewicht durch Auffüllen mit Wasser ersetzt und nach Abkühlen des Gels auf ungefähr 50°C Ethidiumbromid auf eine Konzentration von 0,5 µg/ml eingestellt, und das Gel gegossen. Nach Beladen des Gels mit den Proben wurde die Elektrophorese bei einer Feldstärke von maximal 15V/cm in 1× TAE durchgeführt.

2.2.1.6.2 *Extraktion von DNA aus Agarosegelen*

Die Extraktion von DNA Fragmenten nach restriktionsendonucleolytischem Verdau oder PCR-Produkten aus Agarosegelen wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Zunächst wurde ein 1,5 ml Eppendorfgeläß, in das das Gelstück nach dem Ausschneiden überführt wurde, abgewogen. Nach Bestimmung des Gewichts des Gelstücks wurden 3 Volumina (100 mg ~ 100 µl) Puffer QG zugegeben und 10 min bei 50°C unter gelegentlichem Vortexen inkubiert, um das Gelstück aufzulösen. Bei DNA-Fragmenten, die kürzer als 500 bp oder länger als 4000 bp waren, wurde ein Gelvolumen Isopropanol zugegeben bevor die Lösung in Portionen zu maximal 800 µl auf QIAquick spin Säulchen gegeben wurde und 1 min bei 14000 Upm zentrifugiert wurde, um die DNA an die Säule zu binden. Bei kritischen Anwendungen wurden nochmals 500 µl QG Puffer auf die Säule gegeben und nochmals 1 min bei 14000 Upm zentrifugiert. Dann wurden 750 µl PE Puffer auf die Säule pipettiert und 1 min bei 14000 Upm zentrifugiert um die Säule zu waschen. Bei kritischen

Anwendungen wurde vor der Zentrifugation eine Inkubation von 2 bis 5 min durchgeführt und ein zweiter Waschschrift angeschlossen. Schließlich wurde der Durchfluß verworfen und 1 min bei 14000 Upm trocken zentrifugiert. Bei kritischen Anwendungen wurden Ethanolrückstände auf dem die Säule umgebenden Ring mit der Pipette abgenommen oder die Säule 2 bis 5 min luftgetrocknet. Zur Elution wurden schließlich 30 oder 50 µl EB Puffer oder TE Puffer auf die Säule pipettiert und nach einer Inkubationszeit von 1 bis 3 min durch 1 min Zentrifugation bei 14000 Upm die DNA von der Säule eluiert. Je nach gewünschter DNA Menge und Konzentration wurde der Elutionsschritt gegebenenfalls wiederholt.

2.2.1.7 Nucleinsäuresequenzierung mit der Didesoxynucleotidmethode

Nucleinsäuresequenzierungen wurden mit dem *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP* nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurde für jede zu sequenzierende Probe ein DNA-Mix hergestellt. Dieser bestand aus 10 µl Plasmid-DNA Lösung für Präparationen mit dem E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit II oder 5 µl Plasmid-DNA Lösung für Präparationen nach der CTAB-Methode, 1 µl DMSO, 2 pmol IRD800-markiertem Primer und Wasser ad 26 µl. In einer 96-well-PCR-Platte wurden jeweils 2 µl Terminationsmix (A Reagens, C Reagens, G Reagens oder T Reagens) vorgelegt, jeweils 6 µl des DNA-Mixes zupipettiert und mit einem Tropfen Wachs überschichtet. Die Sequenzierreaktion wurde im Omn-E Thermal Cycler durchgeführt. Zunächst wurde 2 min bei 95°C denaturiert und anschließend 30 Zyklen lang bei 95°C für 15 s denaturiert, 15 s bei 61°C hybridisiert und 15 s bei 70°C elongiert. Abschliessend wurde für 5 min bei 20°C inkubiert und das Reaktionsprodukt nach Zugabe von 8 µl Stopplösung bis zur Elektrophorese bei 4°C gelagert. Die Elektrophorese erfolgte im 6%igen Polyacrylamidgel (42%(w/v) Harnstoff, 1×TBE) mit dem LI-COR DNA Sequencer Model 4000.

Tabelle 3. Primer für die Nucleinsäuresequenzierung

Sequenzierprimer	Farbstoff	Sequenz
IR RVp3 Forward Primer für pGL3-Plasmide	IRD-800	5´-CTA GCA AAA TAG GCT GTC CCC AGT-3´
IR GLp2 Reverse Primer für pGL3-Plasmide	IRD-800	5´-TGT TTT TGG CGT CTT CCA TGG TGG-3´
IR M13 universal neu Forward Primer für pCR4-TOPO, pGEM, pBluescript	IRD-800	5´-GTT GTA AAA CGA CGG CCA GT-3´
IR M13 reverse Reverse Primer für pCR4-TOPO, pGEM, pBluescript	IRD-800	5´-AGG AAA CAG CTA TGA CCA TG-3´

2.2.2 PolyA+ RNA Isolierung

2.2.2.1 Ernte der Zellen

Die Zellen wurden zunächst zweimal mit 1×PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe eines Gummischabers von der Platte abgelöst, in ein Plastikröhrchen überführt und mit 1×PBS auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot entnommen. Nach 10 min Abzentrifugieren bei 1000 Upm (Hettich Rotanta/S, 23%) wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Lyse der Zellen

Nach dem Auftauen der Zellen im Wasserbad bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert und maximal $2\text{-}5 \times 10^7$ Zellen/ml in Zellsuspensionspuffer resuspendiert. Durch Zugabe von Proteinase K-Lösung auf eine Endkonzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ und SDS auf eine Endkonzentration von 1% und Mischen wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurde die DNA durch Behandlung mit einem Dispergiergerät (Ultra Turrax T8; max. Einstellung 25000 Upm) für 30 s bis 1 min geschert. Schliesslich wurde die Proteinase K Konzentration auf 300 $\mu\text{g/ml}$ eingestellt und für 2 bis 3 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

2.2.2.3 Aufbereitung und Nachbereitung der Oligo(dT)-Cellulose

Die in Bindungspuffer gelagerte Oligo(dT)-Cellulose wurde für 1 bis 2 min bei 500 Upm abzentrifugiert und mit 0,1 M NaOH durch gründliches Mischen im Plastikröhrchen gewaschen. Anschliessend wurde, nach jeweiligem Pelletieren für 1 bis 2 min bei 500 Upm einmal mit DEPC-behandeltem Wasser und zweimal mit Bindungspuffer gewaschen. Abschliessend wurde der pH des Überstandes kontrolliert (Sollwert 7,2 bis 7,5). Nach der RNA Isolierung wurde die Cellulose auf identische Weise behandelt und in Bindungspuffer mit 0,09% NaN_3 bei 4°C gelagert.

2.2.2.4 Chromatographie

Vor der Chromatographie wurden die Plastiksäulen jeweils mit 10 ml 0,1 M NaOH, 10 ml DEPC-behandeltem Wasser und 2×10 ml Bindungspuffer gespült. 50 ml Zellysat wurden zu 1 ml Bettvolumen Oligo(dT)-Cellulose gegeben und unter ständigem, langsamem Mischen für mindestens 2 h oder über Nacht inkubiert. Nach Pelletieren durch 1 bis 2 min Zentrifugation bei 500 Upm wurde mit 20 ml Bindungspuffer/ml Bettvolumen im Plastikröhrchen gewaschen. Nach Resuspendieren des Pellets in Bindungspuffer wurde die Suspension auf die vorbereitete Plastiksäule gegeben und 2 bis 3 mal mit 5ml Bindungspuffer gewaschen. Dann wurde dreimal mit 5 ml Waschpuffer/ml Bettvolumen gewaschen und die PolyA⁺ RNA mit 5 ml Elutionspuffer/ml Bettvolumen in ein 14 ml Rundbodenröhrchen (Greiner #187261) eluiert.

2.2.2.5 RNA-Präzipitation

Mit 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 wurde eine Endkonzentration von 0,2M NaAcetat eingestellt und anschliessend 3 Volumina Ethanol zugegeben. Nach gründlichem Vortexen wurde die RNA durch 30 min Inkubation bei -80°C oder über Nacht bei -20°C gefällt. Durch 30 min Zentrifugation bei 4°C und $>6000\text{ g}$ (Sorvall RC2B, SS34 Rotor; 7300 Upm) wurde das Präzipitat pelletiert und nach vorsichtigem Abpipettieren des Überstandes luftgetrocknet. Das Pellet wurde in maximal 360 μl DEPC-behandeltem Wasser gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Einstellen auf 0,2 M NaAcetat, Zugabe von 3 Volumina Ethanol, Mischen und 30 min Inkubation bei -80°C erneut gefällt. Nach 15 min Zentrifugation bei 14000 Upm in der Eppendorf-Tischzentrifuge 5417C wurde wiederum der Überstand abgenommen, das Pellet luftgetrocknet und nach Lösen des Pellets im gewünschten Volumen DEPC-behandelten Wassers die Konzentration der RNA bestimmt. Die PolyA⁺ RNA wurde dann erneut gefällt und als Präzipitat bei -20°C gelagert.

2.2.3 *Primer Extension*

2.2.3.1 Radioaktive Markierung und Aufreinigung der Oligonucleotidprimer

Zur radioaktiven Markierung des Oligonucleotidprimers 5'-GGACAGGAGTATTAGCTTATTCTCTGTC-3' wurde folgender Reaktionsmix in der angegebenen Reihenfolge zusammenpipettiert: 1,5 μl H₂O, 1 μl 10 \times T4 Polynucleotidkinasepuffer, 1 μl 0,1 M Dithiothreitol, 1 μl 1 mM Spermidin, 1 μl Oligonucleotidprimerlösung 10 pmol/ μl , 3 μl [γ -³²P] ATP 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 1,5 μl T4 Polynucleotidkinaselösung 10 U/ μl entsprechend 15 U. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurde die Markierungsreaktion durch Zugabe von 2 μl 0,5 M EDTA und 50 μl TE Puffer und 5 min Inkubation bei 65°C abgestoppt. Anschließend wurde der markierte Primer durch Gelfiltration von nicht eingebauten radioaktiven Nucleotiden abgetrennt.

2.2.3.2 Hybridisierung und Primer Extension

10 μl polyA⁺ RNA Lösung (20 μg) wurden mit 1,5 μl 10 \times Hybridisierungspuffer und 3,5 μl des radioaktiv markierten Oligonucleotids ($\sim 1,5 \times 10^6$ cpm) zusammenpipettiert. Dann wurde 90 min bei 65°C im Heizblock zur Hybridisierung inkubiert und anschließend wurden die Ansätze langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Auf Eis wurde folgender Reaktionsmix hergestellt: 0,9 μl 1 M Tris-Cl pH 8,3, 0,9 μl 0,5 M MgCl₂, 2,5 μl 0,1 M Dithiothreitol, 6,75 μl Actinomycin D 1 mg/ml (wässrige Lösung), 0,66 μl 10 mM dNTP Mix, 18,42 μl H₂O, 0,2 μl AMV Reverse Transkriptase Lösung 25 U/ μl entsprechend 5 U. Von diesem Reaktionsmix wurden jeweils 30 μl zum hybridisierten Reaktionsansatz pipettiert und 1 h bei 42°C inkubiert. Dann wurden jeweils 105 μl RNase Reaktionsmix zu jedem Ansatz zupipettiert und 15 min bei 37°C inkubiert.

2.2.3.3 Gelelektrophorese und Detektion

Nach Zugabe von 15 µl 3 M Natriumacetat wurde mit 150 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 (v/v/v) extrahiert und die obere, wässrige Phase jeweils in ein frisches Tube überführt. Durch Zugabe von 300 µl 100% Ethanol wurde präzipitiert und nach einmaligem Waschen mit 100 µl 70% Ethanol das Pellet 5 bis 10 min lang luftgetrocknet. Nach Resuspendieren der Pellets in jeweils 5 µl Stop/Ladepuffer (EXCEL II Kit) wurde eine Elektrophorese im 9% Acrylamid/7 M Harnstoffgel durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande das Gelende erreicht hatte. Anschließend wurde das Gels getrocknet und die Signale durch Exposition eines XOMat Films detektiert.

2.2.4 *RNA Ligase-mediated Rapid Amplification of cDNA Ends*

Die Ermittlung der Transkriptionsstartstelle des PXR Gens in menschlicher Leber, im Darm und in LS174T Zellen wurde durch *RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends* (RLM-RACE) mit dem GeneRacer™ Kit (Invitrogen) gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

2.2.4.1 Dephosphorylierung der RNA

Zur Dephosphorylierung der RNA wurde folgender Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl pipettiert: 5 µg Gesamt-RNA aus Leber, 5 µg Gesamt-RNA aus Darm, 500 ng polyA⁺ RNA aus LS174T Zellen oder 1 µg HeLa-Kontroll-RNA, 1 µl 10× CIP Buffer, 1 µl RNaseOUT (40 U/µl), 1 oder 2 µl CIP (10 U/µl), DEPC-H₂O ad 10 µl. Der Ansatz wurde durch Auf- und Abpipettieren gemischt, kurz gevortext und nach kurzem Abzentrifugieren 1 h bei 50°C inkubiert und anschließend nach erneutem kurze Abzentrifugieren auf Eis verbracht.

2.2.4.2 Präzipitation der RNA

Zur Abtrennung der Komponenten der Dephosphorylierungsreaktion wurde die RNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und gefällt. Hierzu wurden zur dephosphorylierten RNA 90 µl DEPC-H₂O und 100 µl Phenol/Chloroform-Gemisch zupipettiert und 30 s gevortext. Nach 5 min Zentrifugation bei 14000 Upm (Eppendorf Tischzentrifuge 5417C) wurde die obere, wässrige Phase in ein frisches Eppendorfgesäß überführt und 2 µl Muschelglykogen (10 mg/ml) und 10 µl 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 zugegeben. Nach Mischen durch Schnippen des Gefäßes wurden 220 µl 95% Ethanol zugegeben und nach kurzem Vortexen zur Fällung der DNA 10 min auf Trockeneis gestellt. Das Präzipitat wurde durch 20 min Zentrifugation bei 14000 Upm pelletiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurden 500 µl 75% Ethanol zugegeben und das Pellet durch mehrmaliges Invertieren des Tubes gewaschen. Dann wurde 2 min bei 14000 Upm zentrifugiert, wiederum der Überstand abgenommen, nochmals bei 14000 Upm zentrifugiert, um Ethanolreste zu sammeln, diese mit der

Pipette abgenommen und das Pellet 1 bis 2 min luftgetrocknet und anschließend in 7 μ l bzw. 6 μ l bei mehr als 250 ng mRNA μ l DEPC-H₂O resuspendiert.

2.2.4.3 Entfernung der CAP-Struktur

Zur Entfernung der CAP-Struktur wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

6 bzw. 7 μ l RNA-Lösung, 1 μ l 10 \times TAP Buffer, 1 μ l RNaseOUT (40 U/ μ l), 1 bzw. 2 μ l TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) 0,5 U/ μ l. Nach Mischen des Ansatzes durch Auf- und Abpipettieren, kurzem Vortexen und anschließendem kurzen Abzentrifugieren wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde kurz abzentrifugiert und der Ansatz auf Eis verbracht und die RNA erneut durch Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende Fällung wie oben beschrieben aufgereinigt..

2.2.4.4 Ligation des RNA Oligonucleotids mit der modifizierten mRNA

Die in 7 μ l gelöste, dephosphorylierte und von der CAP-Struktur befreite RNA wurde in das Tube mit den als Lyophilisat vorliegenden 25 μ g GeneRacer™ RNA Oligonucleotid (5'-CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA-3') pipettiert und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren sowohl das Oligonucleotid resuspendiert als auch der Ansatz gemischt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde 5 min bei 65°C inkubiert, um die Sekundärstruktur der RNA aufzulösen, das Tube anschließend für 2 min auf Eis gestellt und dann kurz abzentrifugiert. Es wurden 1 μ l 10 \times Ligase Buffer, 1 μ l 10 mM ATP, 1 μ l RNaseOUT (40 U/ μ l) und 1 μ l T4 RNA Ligase (5 U/ μ l) zupipettiert und 1 h bei 37°C ligiert. Nach kurzem Abzentrifugieren des Reaktionsansatzes und Verbringen auf Eis wurde die RNA wiederum durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt, anschließend gefällt und schließlich in 10 μ l DEPC-H₂O resuspendiert.

2.2.4.5 Reverse Transkription

Zur cDNA-Synthese wurden zu den 10 μ l des Ligationsproduktes 1 μ l Random Hexamer Primer zugegeben, dann zur Auflösung von RNA Sekundärstrukturen 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend 2 min auf Eis gestellt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden 1 μ l 100 mM dNTP (je 25 mM), 2 μ l 10 \times RT Buffer, 1 μ l AMV-RT (5 U/ μ l), 4 μ l steriles H₂O und 1 μ l RNaseOUT (40 U/ μ l) zupipettiert und bei 42°C für 1 h inkubiert. Um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren wurde danach 15 min bei 85°C inkubiert und kurz abzentrifugiert.

2.2.4.6 Polymerase Chain Reaction

Um die synthetisierte cDNA zu amplifizieren wurde ein 50 μ l Reaktionsansatz bestehend aus 2 μ l cDNA Matrize, 10 μ l 5 \times ThermoZyme™ Puffer, 1 μ l 10 μ M GeneRacer™ 5' Primer, 1 μ l 10 μ M PXR-spezifischer Primer, 5 μ l dNTP (je 2 mM), 1 μ l (1 U/ μ l) ThermoZyme™ DNA Polymerase und 30 μ l H₂O pipettiert.

Tabelle 4. Oligonucleotide für RLM-RACE-PCR

	Sequenz
GeneRacer™ 5´ Primer	5´ -CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA-3´
PXR-spezifischer Primer	5´ -GAC TTC TCC CCT GGG GTC CAC TT-3´

Die Amplifikation erfolgte durch PCR mit einem *touchdown*-Temperaturprofil. Zunächst wurde ein *hot start* für 2 min bei 94°C durchgeführt, anschließend 5 hochstringente Zyklen aus 30 s Denaturierung bei 94°C gefolgt von 1 min Annealing und Extension bei 72°C. Dann folgten 5 stringente Zyklen aus 30 s Denaturierung bei 94°C, 30 s Annealing bei 70°C und 1 min Extension bei 72°C. Schließlich wurden 30 niedrigstringente Zyklen aus 30s Denaturierung bei 94°C, 30 s Annealing bei 68°C und 1 min Extension bei 72°C durchgeführt, gefolgt von 10 min bei 72°C zur vollständigen Extension von partiell amplifizierten Strängen und Kühlung auf 4°C bis zur Entnahme des Reaktionsprodukts. Das Reaktionsprodukt wurde im 1%igen Agarosegel aufgetrennt und nach dem Ausschneiden der gewünschten Banden in eine S.N.A.P.™ Säule gegeben und die DNA durch 1 min Zentrifugation bei 14000 Upm aus dem Gel eluiert.

2.2.4.7 TOPO TA Klonierung und Sequenzierung

Die Klonierung des erhaltenen PCR-Produktes wurde mit dem *TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing* durchgeführt. Zu 4 µl des frisch eluierten DNA-Fragment wurden 1 µl 1,2 M NaCl und 60 mM MgCl₂ Salzlösung und 1 µl pCR®4-TOPO® Vektor (10 ng/µl) gegeben. Nach Mischen des Reaktionsansatzes wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wie oben beschrieben TOP10F´ Zellen mit dem Reaktionsprodukt transformiert, propagiert und die Plasmid-DNA isoliert. Die Sequenzierung der erhaltenen Klone zur Ermittlung der Transkriptionsstartstelle erfolgte gemäß dem oben beschriebenen Protokoll von beiden Seiten des klonierten PCR-Fragmentes mit dem IR M13 reverse und dem IR M13 universal neu Primer.

2.2.5 Quantitative Reverse Transkription-Polymerase Chain Reaction

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Lebergewebe der Studie IKP148, sowie die Bestimmung der RNA Konzentration und die Kontrollgele zur Überprüfung der Qualität der präparierten RNA wurden mehrheitlich von Frau Dr. Kathrin Klein und Herrn Igor Liebermann durchgeführt.

2.2.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Lebergewebe der Studie IKP148 wurde mit dem RNeasy Midi Kit (Qiagen) durchgeführt. Nach dem Auftauen des in RNAlater Puffer gelagerten Lebergewebes wurde ein ungefähr 250 mg schweres Gewebestück präpariert und dieses in 3,8 ml RLT Puffer mit 1%(v/v) β-Mercaptoethanol, welche in ein 15 ml Falconröhrchen vorgelegt waren, gegeben. Dann

wurde ungefähr 45 s im Kühllabor mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Zwischen den Homogenisationsschritten verschiedener Gewebestücke wurde der Turrax mit NaOH/EDTA, Ethanol und DEPC-behandeltem Wasser gespült. Das Homogenat wurde 10 min bei 4000 Upm zentrifugiert (Hettich), der Überstand zu 3,8 ml 70%igem Ethanol gegeben und sofort gemischt. Das Gemisch wurde in zwei Schritten auf die Chromatographiesäulchen gegeben und jeweils 5 min bei 4000 Upm zentrifugiert. Um eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA zu minimieren, wurde eine DNase-Behandlung mit dem RNase-free DNase Set (Qiagen) in das Protokoll integriert. Dazu wurden zunächst 2 ml RW1 Puffer auf die Säulchen gegeben und 5 min bei 4000 Upm zentrifugiert. Dann wurden pro aufzuarbeitender Probe 20 µl DNaseI Stammlösung zu 140 µl RDD Puffer gegeben und diese 160 µl auf die Säule gegeben. Es erfolgte eine Inkubation über 15 min mit dem DNaseI-Mix. Dann wurden erneut 2 ml RW1 Puffer auf die Säule gegeben und bei 4000 Upm 5 min zentrifugiert. Schließlich wurden 2,5 ml RPE Puffer zugegeben, 2 min bei 4000 Upm zentrifugiert, erneut 2,5 ml RPE Puffer zugegeben und anschließend 5 min bei 4000 Upm zentrifugiert, um ein vollständiges Abzentrifugieren des Puffers zu gewährleisten. Zur Elution der RNA wurden 150 µl RNase-freies Wasser auf die Säule pipettiert, 3 min bei 4000 Upm zentrifugiert, erneut 150 µl RNase-freies Wasser zupipettiert und 5 min bei 4000 Upm zentrifugiert.

Die Bestimmung der Konzentration der isolierten RNA erfolgte durch Extinktionsmessung. Die isolierte RNA wurde zunächst 1 zu 10 mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnt und die RNA-Konzentration durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem GeneQuant (Pharmacia) Photometer bestimmt. Zur Überprüfung der mit dem Photometer bestimmten RNA-Konzentration und zur Kontrolle der Qualität der Präparation und eventueller Degradation der RNA wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA im 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Darmgewebe der Gewebesammelstudie IKP113 und der Rifampicin-Digoxin-Interaktionsstudie IKP112 erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) analog zur beschriebenen Methode gemäß den Anweisungen des Herstellers.

2.2.5.2 cDNA Synthese

Die Reverse Transkription der Gesamt-RNA wurde mit dem TaqMan® Reverse Transcription Reagents Kit (Applied Biosystems/Roche) gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Für die cDNA Synthese aus 200 ng Gesamt-RNA wurde ein Ansatz aus 1 µl 10× TaqMan RT Puffer, 2,2 µl 25 mM Magnesiumchlorid, 2 µl 2,5 mM dNTP Mix, 0,5 µl 50 µM Random Hexamer Primer, 0,2 µl 20 U/µl RNase Inhibitor, 0,25 µl 100U/µl MultiScribe Reverse Transcriptase, 200 ng Gesamt-RNA und RNase-freies Wasser ad 10 µl pipettiert. Bei cDNA Synthesen aus größeren RNA Mengen wurden die eingesetzten Volumina entsprechend proportional vergrößert.

Tabelle 5. Zusammensetzung der cDNA-Synthesereaktion aus 200 ng RNA für die qRT-PCR.

Komponente	C _{Stamm}	Volumen	C _{final}
TaqMan RT Puffer	10×	1 µl	1×
Magnesiumchlorid	25 mM	2,2 µl	5,5 mM
DesoxyNTP-Mix	2,5 mM	2,0 µl	500 µM
Random Hexamere	50 µM	0,5 µl	2,5 µM
RNase Inhibitor	20 U/µl	0,2 µl	0,4 U/µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	100 U/µl	0,25 µl	1,25 U/µl
Gesamt-RNA		x µl	200 ng
RNase-freies Wasser		3,85 – x µl	

Der Reaktionsansatz wurde zunächst 10 bis 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Extension der Random Hexamer Primer durch die Reverse Transkriptase zu ermöglichen. Anschließend wurde die cDNA Synthese 1 h bei 48°C durchgeführt und das Enzym abschließend 5 min bei 95°C inaktiviert. Zum Reaktionsprodukt wurden danach auf das 2,5-fache Volumina verdünnt, so dass eine Endkonzentration an cDNA entsprechend 8 ng/µl eingesetzter Gesamt-RNA vorlag. Für die Bestimmung der RNA Expression von β -Actin wurde eine weitere Verdünnung um den Faktor 50, für die Bestimmung der 18S rRNA eine Verdünnung um den Faktor 1000 vorgenommen.

2.2.5.3 Real-time Polymerase Chain Reaction

Die quantitative Bestimmung der RNA Expression von CYP3A4, PXR, MDR1, β -Actin und 18S rRNA wurde als Real-time PCR mit dem ABI Prism™ 7700 Sequence Detector (Perkin Elmer) durchgeführt. Die Oligonucleotidprimer und –sonden wurden mit Hilfe der Primer Express™ Software Version 1.5 (Applied Biosystems) ausgewählt.

Tabelle 6. Verwendete Oligonucleotidkonzentrationen und RNA-Mengen für die qRT-PCR

	Forward Primer C _{final} [nM]	Reverse Primer C _{final} [nM]	Sonde C _{final} [nM]	Sonden- Farbstoff	eingesetzte RNA-Menge
CYP3A4	400	400	200	FAM	40 ng
PXR	400	400	200	FAM	40 ng
MDR1	300	300	200	FAM	40 ng
Villin	400	400	200	FAM	800 pg [§]
β -Actin	*	*	*	VIC	800 pg [§]
18S rRNA	*	*	*	VIC	40 pg [§]

*für die Bestimmung der RNA Expression der Haushaltsgene β -Actin und 18S rRNA wurden *pre-developed assay reagent Kits* (PDAR) von Applied Biosystems verwendet.

[§]für die Bestimmung der β -Actin und Villin Expression wurde ein 1:50, für die der 18S rRNA Expression ein 1:1000 verdünntes Aliquot des cDNA-Syntheseprodukts verwendet.

Die für die Reaktion eingesetzten RNA Mengen und verwendeten Oligonucleotidprimer und –sonden für die einzelnen Gene sind in den Tabellen 6 und 7 aufgeführt.

Die PCR Reaktionsansätze wurden in 96-well Platten (Applied Biosystems und ABgene) in einem Endvolumen von 25 µl angesetzt, bestehend aus 12,5 µl 2× Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 5 µl cDNA Matrize, Oligonucleotidprimern (MWG Biotech) und –sonde (Applied Biosystems) und Wasser ad 25 µl. Das Temperaturprofil der PCR-Reaktion ist in Tabelle 8. dargestellt.

Tabelle 7. Oligonucleotidprimer und –sonden für qRT-PCR von CYP3A4, PXR und MDR1 und Villin

Oligonucleotid	Sequenz
CYP3A4	
Forward Primer	5´-TGT CCT ACC ATA AGG GCT TTT GTA T-3´
Reverse Primer	5´-TTC ACT AGC ACT GTT TTG ATC ATG TC-3´
Sonde	5´-CTT TTA TGA TGG TCA ACA GCC TGT GCT G-3´
PXR	
Forward Primer	5´-TGA ATG CAA TCG GCC CC-3´
Reverse Primer	5´-CGG AGC TCG GTG AGC ATA GC-3´
Sonde	5´-CCT GCT CAT AGG TTC TTG TTC CTG AAG ATC AT-3´
MDR1	
Forward Primer	5´-TAG AAG ATC TGA TGT CAA ACA TCA CTA ATA GA-3´
Reverse Primer	5´-GTG TAT TTG TCT TCC AGC TGC C-3´
Sonde	5´-AGG AAG ACA TGA CCA GGT ATG CCT ATT ATT ACA G-3´
Villin	
Forward Primer	5´-CTG GCA ACC TTA GGG ACT GG-3´
Reverse Primer	5´-GTT AGC ATT GAA CAC GTC CAC TTT-3´
Sonde	5´-CCA GAT CAC TGC TGA GGT CAC AAG C-3´

Tabelle 8. Temperaturprofil der *Real time-PCR*

Schritt	9 [°C]	t
UNG Inkubation	50	2 min
Polymeraseaktivierung	95	10 min
40 Zyklen:		
Denaturierung	95	15 s
Annealing und Extension	60	60 s

Als Kalibriermaterial für die Bestimmung der CYP3A4, PXR und MDR1 mRNA Expression wurden cDNA-Plasmide der entsprechenden Gene verwendet, für die Bestimmung von β -Actin und 18S rRNA wurde cDNA verwendet, die aus Gesamt-RNA aus Lebergewebe (Kieler Leber KL1) hergestellt worden war (Tabelle 9). Bei der Kalibrierung mit Plasmiden wurde eine sequentielle 1:10 Verdünnungsreihe im Bereich von $0,2 \times 10^{-9}$ g bis $0,2 \times 10^{-15}$ g hergestellt, so dass beim Einsetzen von 5 μ l Plasmid-DNA die Plasmidmassen 1×10^{-9} g bis 1×10^{-15} g betragen. Bei der Kalibrierung mit cDNA aus Leber war der eingesetzte Kalibrierbereich von 1×10^{-7} g bis 1×10^{-13} g.

Tabelle 9. Zur Kalibrierung der quantitativen RT-PCR verwendete Plasmide und Material und eingesetzte Kalibrierungen

Gen	Kalibriermaterial	Kalibrierbereich
CYP3A4	Plasmid pUVI/3A4	1×10^{-9} bis 1×10^{-15} g
PXR	Plasmid pcDhuPXR	1×10^{-9} bis 1×10^{-15} g
MDR1	Plasmid pMDR1 V1 5'	1×10^{-9} bis 1×10^{-15} g
Villin	poly A ⁺ RNA aus Caco2 Zellen	1×10^{-7} bis 1×10^{-13} g
β -Actin	Gesamt-RNA aus Leber KL1	1×10^{-7} bis 1×10^{-13} g
18S rRNA	Gesamt-RNA aus Leber KL1	1×10^{-7} bis 1×10^{-13} g

Die Proben der Studie IKP148 wurden aufgrund der hohen Probenzahl von beinahe 100 für jedes zu bestimmende Gen jeweils nur als Einfachwerte gemessen, die Proben der Studien IKP112 und IKP113 jeweils als Dreifachwerte.

Die Primäranalyse der Daten erfolgte mit der Sequence Detection Software V1.7. Die Erstellung von Regressionsgeraden zur Kalibrierung und die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der GraphPad PRISM Software Version 3.02.

2.2.6 Proteinanalytik

Die Präparation der zur Bestimmung der Cytochrom P450 3A4 Proteinexpression verwendeten mikrosomalen Fraktionen sowie die Bestimmung der Proteinkonzentration der Präparationen wurden hauptsächlich von Frau Dr. Kathrin Klein und Herrn Igor Liebermann durchgeführt.

2.2.6.1 Präparation der mikrosomalen Fraktion aus humanem Lebergewebe

Für die Präparation der Mikrosomenfraktion wurde ein Lebergewebestück von ungefähr 1 g abgewogen und in ein 10 ml Polyethylenröhrchen (Greiner) mit 4 ml Homogenisierungspuffer gegeben. Mit einem Ultraturrxhomogenisator wurde das Gewebestück zwei- bis dreimal 10 s lang bei 9500 Upm auf Eis solange zerkleinert, bis keine mit bloßem Auge gut erkennbaren Gewebestückchen

zu erkennen waren. Anschließend wurde die Suspension mit einem Dounce Homogenisator bei 1000 Upm mit 5 bis 10 Hieben auf Eis weiter homogenisiert. Vom Homogenat wurden jeweils zwei 150 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Homogenat wurde in dickwandige Zentrifugenröhrchen überführt, und nach Austarieren mit Homogenisierungspuffer im Rotor MLA-80 bei 17000 Upm (15000 g) 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein frisches 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Das Kernpellet wurde in 2 ml HB mit einem Handpotter resuspendiert die Suspension erneut bei 17000 Upm 30 min zentrifugiert und der Überstand mit dem Überstand des vorhergegangenen Zentrifugationsschritt vereinigt. Die vereinigten Überstände wurden dann im Rotor MLA-80 bei 45000 Upm (105000 g) 60 min ultrazentrifugiert. Nach Abnehmen des Cytosol-Überstandes wurde das Pellet im Handpotter mit 2 ml Mikrosomenwaschlösung aufgeschlämmt und schließlich nochmals bei 45000 Upm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 2 ml Mikrosomenpuffer aufgeschlämmt, anschließend mit einem Dounce-Homogenisator homogenisiert und nach Volumenbestimmung und Aliquotieren bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration der mikrosomalen Fraktionen wurde im Mikrotiterformat nach Bradford bestimmt. Zunächst wurden die Mikrosomenlösungen 1 zu 10 mit Wasser verdünnt und 4 Volumina Reagens (BioRad) wurden mit 6 Volumina Wasser vorverdünnt. Nach Zugabe von 100 µl vorverdünntem Reagens zu 100 µl verdünnter Probe wurde 10 min inkubiert und anschließend die Absorption bei der Wellenlänge von 595 nm im VICTOR™ 1420 Multilabel Counter (Wallac) gemessen. Die Kalibrierung der Proteinkonzentration erfolgte mit einer Verdünnungsreihe von in Wasser gelöstem Rinderserumalbumin. Nach der Proteinbestimmung wurden jeweils 10 µg Protein durch denaturierende Elektrophorese im 10%igen Polyacrylamidgel getrennt und durch nachfolgende Coomassie-Färbung das Ergebnis der Proteinbestimmung verifiziert.

2.2.6.3 Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Western Blot Analyse wurden jeweils 12,5 µg Protein der mikrosomalen Fraktion mit 2× Tris-Glycin SDS Probenpuffer (Invitrogen) und Wasser auf ein Volumen von 25 µl eingestellt und über Nacht im Polyacrylamidgel (4% Sammelgel/10% Trenngel) aufgetrennt.

Als Kalibrierproben für die Bestimmung von Cytochrom P450 3A4 wurde rekombinant in menschlichen Lymphoblasten hergestelltes CYP3A4 Protein (GENTEST) verwendet. Die Kalibrierproben wurden auf Konzentrationen von 80, 40, 20, 10, 5 und 2,5 fmol CYP3A4/µl und mit TN5 Mikrosomen, einer mikrosomalen Präparation aus einer Insektenzelllinie, welche keine Cytochrome P450 exprimiert, auf eine Gesamtproteinkonzentration von 0,5 µg/µl in 1× Tris-Glycin SDS Probenpuffer eingestellt. Die Kalibrierprobenreihe wurde auf jedem Blot mitgeführt.

2.2.6.4 Semi Dry Blotting

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel sowie sechs Whatman Filterpapiere 10 min. in Transferpuffer äquilibriert. Die Polyvinylidendifluoridmembran wurde ebenfalls, nach kurzem Einwirken von Methanol, um eine Benetzung mit wässrigen Lösungen zu ermöglichen, 10 min in Transferpuffer gelegt. Der Transfer vom Gel auf die Membran erfolgte mit der Trans Blot SD[®] Semi-Dry Transfer Cell Blot-Kammer (BioRad). Als unterste Schicht wurden drei getränkte Filterpapiere auf die untere Elektrode gelegt, dann folgte die Membran, das Polyacrylamidgel und abschließend nochmals drei Filterpapiere. Der Transfer erfolgte über 1,5 h bei 150 mA.

Der gleichmäßige Transfer beim Blotten und die gleichmäßige Proteinbeladung des Gels wurde nach dem Blotten durch Färbung der PVDF Membran mit Ponceau S Lösung überprüft. Die Membran wurde zur Proteinfärbung 5 min in Ponceau S geschwenkt und anschließend dreimal kurz mit Wasser gewaschen und anschließend 5 min in Wasser geschwenkt, um unspezifische Anfärbung zu entfernen. Die gefärbte Membran wurde photokopiert und die Proteinfärbung mit TBST-T wieder entfernt.

2.2.6.5 Immunchemische Detektion

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran 1 h in Blockingpuffer geschwenkt. Dann erfolgte die Inkubation mit dem 1:500 in Blockingpuffer verdünnten *rabbit anti-human CYP3A4* Primärantikörper über 1 h. Zur Entfernung von nicht gebundenem Primärantikörper wurde die Membran einmal mit 25 ml TBST gewaschen und anschließend 2× 10 min mit jeweils 25 ml TBST unter leichtem Schwenken gewaschen. Die Inkubation mit dem 1:50000 in Blockingpuffer verdünnten *peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG F(ab')₂ Fragment specific* Sekundärantikörper erfolgte über 30 min. Dann wurde wiederum einmal mit 25 ml TBST gespült und danach 2× 10 min und zusätzlich 2× 5 min mit jeweils 25 ml TBST unter Schwenken gewaschen.

Die Detektion erfolgte mit dem *SuperSignal WestDura Extended Duration Chemilumineszenz System* (Pierce). Nach kurzem Abtropfenlassen der Membran wurde sie im Dunkeln 5 min in 10 ml Substratlösung (5 ml Lösung 1 + 5 ml Lösung 2) inkubiert. Die Chemilumineszenz wurde mit einer Fuji LAS-1000 CCD Camera (Raytest) gemessen und mittels der Software AIDA 2.31 (Raytest) analysiert und quantifiziert.

2.2.7 Generierung einer Reportergenplasmidbibliothek mit unidirektional deletierten PXR-Promotorfragmenten

2.2.7.1 Generierung des parentalen PXR-Promotor-Reportergenkonstrukts

Als Ausgangspunkt für die Herstellung der Reportergenplasmidbibliothek mit unidirektionalen Verkürzungen der 5' flankierenden Region des PXR Gens wurde zunächst ein Teil der 5' flankierenden Region in das Luciferase-Reportergenplasmid pGL3-Basic subkloniert.

Hierfür wurde als Ausgangsmaterial ein Plasmid verwendet, das freundlicherweise von Frau Elisabeth Hustert (Epidauros AG) zur Verfügung gestellt worden war. In dieses Plasmid war der Bereich des PXR Gens, der dem Bereich zwischen Position 2203146 bis 2208578 in der *GenBank* Datenbank (*accession number* NT029257) entspricht, durch einen *EcoRI* Verdau eines BAC-Klons (GenomeSystems GS21908), der das PXR Gen enthält, und anschließende Ligation in den ebenfalls mit *EcoRI* aufgeschnittenen Vektor pUC19 kloniert worden (Hustert et al., 2001b). Da beim Erhalt des Plasmids nicht bekannt war, dass es sich um den Vektor pUC19 handelte, wurde das genomische PXR-Promotorfragment mit *EcoRI* ausgeschnitten und in den Vektor pUC18 subkloniert, um geeignete Restriktionsschnittstellen für das weitere Vorgehen zu erhalten (Abbildung 14). Aufgrund der Ergebnisse der Primer Extension und RLM-RACE-PCR Experimente wurde das Fragment aus dem pUC18 Vektor mit *KpnI* und *BsaWI* ausgeschnitten und in den mit *KpnI* und *XmaI* aufgeschnittenen pGL3-Basic subkloniert und das Promotor-Reportergenkonstrukt pGL3-PXR(-2543) erhalten.

2.2.7.2 Unidirektionale Deletion der 5' flankierenden Region durch restriktionsendonucleolytischen Verdau

Ein Teil der unidirektional Verkürzungen der 5' flankierenden Region wurde unter Verwendung von Restriktionsendonucleasen hergestellt. Dazu wurde das parentale Plasmid pGL3-PXR(-2543) mit *KpnI* oder dessen Isoschizomer *Acc65I* direkt oberhalb des 5' Terminus des Promotorfragmentes aufgeschnitten und parallel oder sequentiell mit einem geeigneten Restriktionsenzym, welches nur einmal in der 5' flankierenden Region, nicht aber im restlichen Vektor schneidet, verdaut. Dadurch wurde jeweils ein Abschnitt der 5' flankierenden Region von definierter Länge vom 5' Ende her entfernt. Die Überhänge der verkürzten, linearisierten Promotor-Reportergenvektoren wurden mit dem Klenow Fragment oder der T4 DNA Polymerase aufgefüllt bzw. getrimmt und die stumpfen Enden religiert und so die verkürzten PXR Promotorfragmente erhalten.

2.2.7.2.1 Restriktionsverdau des parentalen Konstrukt pGL3-PXR(-2543)

Abhängig von der zum Schneiden innerhalb der 5' flankierenden Region eingesetzten Restriktionsendonuclease bzw. ihrer Aktivität in den verwendbaren Restriktionsverdaupuffern wurde das parentale Konstrukt pGL3-PXR(-2543) zusätzlich mit *KpnI* oder dessen Isoschizomer *Acc65I* parallel oder sequentiell verdaut (Tabelle 10).

Tabelle 10. Verwendete Restriktionsendonucleasen, Reaktionsparameter und erhaltene Konstrukte für die Verkürzung des pGL3-PXR(-2543) Konstrukt

Restriktions- endonuclease	<i>BsmBI</i>	<i>SnaBI</i>	<i>Sse8387I</i>	<i>AvrII</i>	<i>ApaI</i>	<i>SmaI</i>
Verdautyp Puffer	sequentiell NEB3	parallel NEB4	parallel NEB2	parallel NEB2	sequentiell NEB4	Sequentiell NEB4
Primärverdau	1 µl <i>Acc65I</i>	1 µl <i>SnaBI</i> 2 µl <i>KpnI</i>	1,66 µl <i>Sse8387I</i> 1,33 µl <i>KpnI</i>	1 µl <i>AvrII</i> 1,33 µl <i>Acc65I</i>	1 µl <i>ApaI</i>	1 µl <i>SmaI</i>
t / 9	1 h @ 37°C	1 h @ 37°C	1 h @ 37°C	1 h @ 37°C	1 h @ 25°C	1 h @ 37°C
Inaktivierung	20 min @ 65°C	-	-	-	20 min @ 65°C	20 min @ 65°C
Sekundärverdau	+1 µl <i>BsmBI</i> +0,1 µl NEB3	-	-	-	+2 µl <i>KpnI</i> +0,2 µl NEB4	+2 µl <i>KpnI</i> +0,2 µl NEB4
t / 9	1 h @ 55°C				1 h @ 37°C	1 h @ 37°C
Konstrukt	pGL3- PXR(-2406)	pGL3- PXR(-1705)	pGL3- PXR(-1486)	pGL3- PXR(-1097)	pGL3- PXR(-805)	pGL3- PXR(-560)

Die überhängenden 5'- oder 3'-Termini der verkürzten, linearen Reaktionsprodukte wurden entweder direkt nach Restriktionsverdau und Inaktivierung der Restriktionsendonucleasen oder nach elektrophoretischer Auftrennung im 0,8%igen Agarosegel und anschließender Elution aus dem Gel mit dem Klenow Fragment oder der T4 DNA Polymerase aufgefüllt bzw. getrimmt, um eine nachfolgende Religation zu ermöglichen.

2.2.7.2.2 Auffüllen der überhängenden Termini mit dem Klenow Fragment

Die überhängenden Enden der verkürzten, linearen Reporterplasmide nach Restriktionsverdau mit *BsmBI* bzw. *AvrII* wurden mit dem Klenow Fragment aufgefüllt. Dazu wurden zu 10 µl des Eluats der Gelextraktion 2 µl 10× *E.coli* Pol Puffer, 1 µl 2 mM dNTP-Mix, 6,5 µl Wasser und 0,5 µl (5 U/µl) Klenow Fragment gegeben. Die Reaktionsansätze wurden 15 min bei 25°C inkubiert, anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5 µl 0,5 M EDTA abgestoppt.

2.2.7.2.3 Trimmen der überhängenden Termini mit der T4 DNA Polymerase

Überhängende Termini der verkürzten, linearen Reporterplasmide nach Restriktionsverdau mit *SnaBI*, *Sse8387I*, *ApaI* und *SmaI* wurden mit der T4 DNA Polymerase getrimmt. Zu 10 µl Eluat der Gelextraktion wurden 2,5 µl 10× T4 DNA Polymerase Puffer, 1 µl 2 mM dNTP-Mix, 10,5 µl Wasser und 1 µl T4 DNA Polymerase pipettiert. Nach 20 min Inkubation bei 11°C im mit Eis eingestellten Wasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5 µl 0,5 M EDTA abgestoppt.

2.2.7.2.4 Religation

Die Reaktionsprodukte der Fill-In- bzw. Trimming-Reaktion wurden mit dem QIAGEN PCR Purification Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Anschließend wurden Ligationsansätze mit jeweils 8 µl des Eluates, 1 µl 10× Ligase Puffer und 1 µl T4 DNA Ligase oder alternativ 6,5 µl Eluat, 1 µl 10× Ligase Puffer, 1 µl T4 DNA Ligase, 1,5 µl 30% PEG8000 pipettiert und über Nacht bei 15°C oder RT religiert. Die Ligationsprodukte wurden anschließend in *E.coli* TOP10F' transformiert und rekombinante Klone selektioniert und propagiert. Nach der Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte die Kontrolle der Identität der verkürzten Promotorkonstrukte durch Restriktionsverdauanalyse und Nucleinsäuresequenzierung.

2.2.7.3 Unidirektionale Deletion der 5'-flankierenden Region durch Verdau mit Exonuclease III

Weitere unidirektionale Verkürzungen der 5'-flankierenden Region des PXR Gens wurden nach einem modifizierten Protokoll mit dem Exo Mung Bean Deletion Kit (Stratagene) generiert. Bei dieser Methode wird ausgenutzt, daß Exonuclease III an 3'-Enden von stumpfen Enden und 5'-Überhängen nucleolytisch angreift, jedoch nicht an 3'-Überhängen.

Zunächst wurden 50 µg des pGL3-PXR(-2543) Konstrukts in einem Volumen von 200 µl mit *KpnI* verdaut, wodurch ein schützender 3'-Überhang am 5'-Terminus des Promotorfragments entstand. Ein Aliquot von 5 µl wurde im 0,8%igen Agarosegel auf die Vollständigkeit des Verdaus überprüft und durch Zugabe von *EcoRI* und anschließenden Verdau ein für Exonuclease III susceptibler 5'-Überhang in 3' Richtung vom geschützten Vektorende erzeugt wurde. Das mit *KpnI* und *EcoRI* verdaute pGL3-PXR(-2543) Plasmid wurde durch Ethanolpräzipitation gereinigt und in 50 µl TE pH 8,0 aufgenommen.

Zu 25 µl der Plasmidlösung wurden 62,5 µl ExoIII Puffer, 12,5 µl 100 mM frisches β-Mercaptoethanol, 20 µl H₂O und 5 µl (20 U/µmol ends) Exonuclease III pipettiert. Dann erfolgte der Verdau mit Exonuclease III bei 31°C, wodurch der susceptible Strang der 5'-flankierenden Region in 5'->3' Richtung verkürzt wird. Um eine Serie von Verkürzungen verschiedener Länge zu erhalten, wurde nach 8, 9, 10, 11 und 12 min ab dem Start der Reaktion jeweils ein Aliquot von 25 µl entnommen und in 175 µl verdünnten 10× Mung Bean Nuclease Puffer („ExoIII Stop Solution“) gegeben. Die entnommenen Aliquots wurden durch Vortexen gemischt und auf Trockeneis gestellt. Nach Ablauf der Reaktion wurden die Aliquots 15 min auf 68°C erhitzt, um die Exonuclease III zu inaktivieren. Anschließend wurde in jedes Aliquot 1 µl 15 U/µl Mung Bean Nuclease gegeben und durch 30 min Inkubation bei 31°C der entstandene Einzelstrang bis zu der Stelle abgedaut, an der der Exonuclease III Verdau abgebrochen hatte und wieder ein DNA-Doppelstrang vorliegt. Die Größen der Reaktionsprodukte in den verschiedenen Aliquots und damit das Ausmaß der unidirektionalen Deletion wurde durch Gelelektrophorese geprüft, wobei als Größenstandard durch *KpnI*-verdautes pGL3-PXR(-2543) und pGL3-Basic Plasmid und mitgeführt wurden. Von den Reaktionsprodukten

geeigneter Länge wurde jeweils 1 µl gemäß dem Herstellerprotokoll recircularisiert und anschließend in *E.coli* TOP10F' transformiert. Von den rekombinanten Klonen wurden jeweils 10 bis 30 in eine Mini-Kultur überführt, propagiert und die Plasmid DNA isoliert. Durch Agarosegelelektrophorese wurden geeignete Klone identifiziert und durch Nucleinsäuresequenzierung deren Verkürzungsausmaß exakt bestimmt.

2.2.8 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde mit dem QuikChange® Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) durchgeführt. Mit diesem Kit können Mutationen in DNA-Plasmiddoppelstränge eingeführt werden. Das Prinzip dieses Mutageneseverfahrens besteht darin, dass die zu mutierende DNA-Plasmidmatrize unter Verwendung eines Oligonucleotidprimerpaars, das komplementär zueinander ist und an derselben Position beider Stränge des Plasmids bindet, und das den oder die gewünschten Nucleotidaustausch(e) bereits enthält, repliziert wird. Durch Durchlaufen eines Temperaturprofils werden die Oligonucleotide durch die *PfuTurbo*® DNA Polymerase elongiert und die gewünschte Mutation inkorporiert. Das Reaktionsprodukt wird mit *DpnI*, einer Restriktionsendonuclease mit der Erkennungssequenz 5'-Gm⁶ATC-3', die also für methylierte und hemimethylierte DNA spezifisch ist, verdaut, so daß die parentalen, in einem methylierenden *E.coli* Stamm vermehrten Plasmide, die die gewünschte Mutation nicht tragen, zerstört werden.

2.2.8.1 Mutagenesereaktion

Zu 5 µl 10× Reaction buffer wurden 50 ng der zu mutierenden Plasmid DNA (pGL3-PXR(-191)), 1 µl dNTP Mix und jeweils 125 ng der beiden Mutageneseprimer pipettiert und mit bidestilliertem Wasser auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Durch Zugabe von 1 µl *PfuTurbo*® (2,5 U/µl) wurde die Reaktion gestartet und das gewählte Temperaturprofil durchlaufen. Zunächst wurde 30 s bei 95°C denaturiert, anschließend in 12 Zyklen 30 s Denaturierung bei 95°C, 1 min Annealing der Oligonucleotidprimer bei 55°C und 10 min Extension bei 68°C. Durch Abkühlen auf 4°C wurde die Reaktion beendet.

Anschließend wurde 1 µl *DpnI* (10 U/µl) zugegeben und nach vorsichtigem Mischen durch Schnippen und kurzem Abzentrifugieren 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurden *E.coli* TOP10F' mit 1 µl des Reaktionsproduktes transformiert, Rekombinante selektioniert und in Mini-Kulturen propagiert. Die Plasmid-DNA der Rekombinanten wurde isoliert und durch Nucleinsäuresequenzierung die erfolgreiche Durchführung der Mutagenese kontrolliert.

2.2.8.2 Subklonierung des mutierten Inserts

Obwohl *PfuTurbo*® die Plasmid DNA bei der Mutagenesereaktion mit hoher Genauigkeit repliziert, und somit das Auftreten zusätzlicher Mutationen neben den durch die Oligonucleotidprimer

inkorporierten im Insert oder im DNA Vektor unwahrscheinlich ist, wurde das mutierte Fragment der 5'-flankierenden Region, dessen Sequenz vollständig sequenziert worden war, in den Ausgangsvektor pGL3-PXR(-191) subkloniert.

Hierzu wurden geeignete Restriktionsschnittstellen ausgewählt (*Eco RV* und *HindIII*) und das mutierte, sequenzierte Fragment von ungefähr 400 bp ausgeschnitten sowie der Ausgangsvektor aufgeschnitten und nach Agarosegelelektrophorese und Extraktion aus dem Gel das mutierte Fragment in den Ausgangsvektor subkloniert. Anschließend wurden wiederum *E.coli* TOP10F' transformiert, rekombinante Klone selektioniert, als Mini-Kulturen propagiert und Plasmid-DNA isoliert. Die erfolgreiche Subklonierung des mutierten Fragments wurde durch restriktionsendonucleolytischen Verdau überprüft.

2.2.9 Generierung und Klonierung von multimerisierten HNF4 α - und GR α Bindungselementen

Die Sequenzen der korrespondierenden, größtenteils komplementären Oligonucleotide (Tabelle 11) wurden so gewählt, dass zu beiden Seiten der Bindungsstelle für HNF4 α oder GR α jeweils 5 Nucleotidylreste wie in der nativen PXR Gensequenz zu beiden Seiten des HNF4 α -RE oder wie in der nativen Gensequenz des Tyrosinaminotransferasegens zu beiden Seiten des GRE vorhanden sind und nach Hybridisierung des jeweiligen Oligonucleotidpaars am 5'-Terminus ein *Bam*HI-Überhang und am 3'-Terminus ein *Bgl*III-Überhang vorliegt.

Tabelle 11. Oligonucleotide für die Herstellung von HNF4 α -RE- bzw. GR α -RE Multimeren

	Sequenz
<i>HNF4α response element</i>	
Sense Oligonucleotid (RW-EMSA-QC1-nm-s)	5' -GATCCGTGCTTGACTTGGGACTTAGGAGA-3'
Antisense Oligonucleotid (RW-EMSA-QC1-nm-as)	5' -GATCTCTCCTAAGTCCCAAGTCCAGCACG-3'
<i>GRα response element</i>	
Sense Oligonucleotid (RW-GR-consensus-s)	5' -GATCCTTGTGGGTACAGAGTGTCTAGGGAA-3'
Antisense Oligonucleotid (RW-GR-consensus-as)	5' -GATCTTCCCTAGAACACTCTGTACCCAGAAG-3'

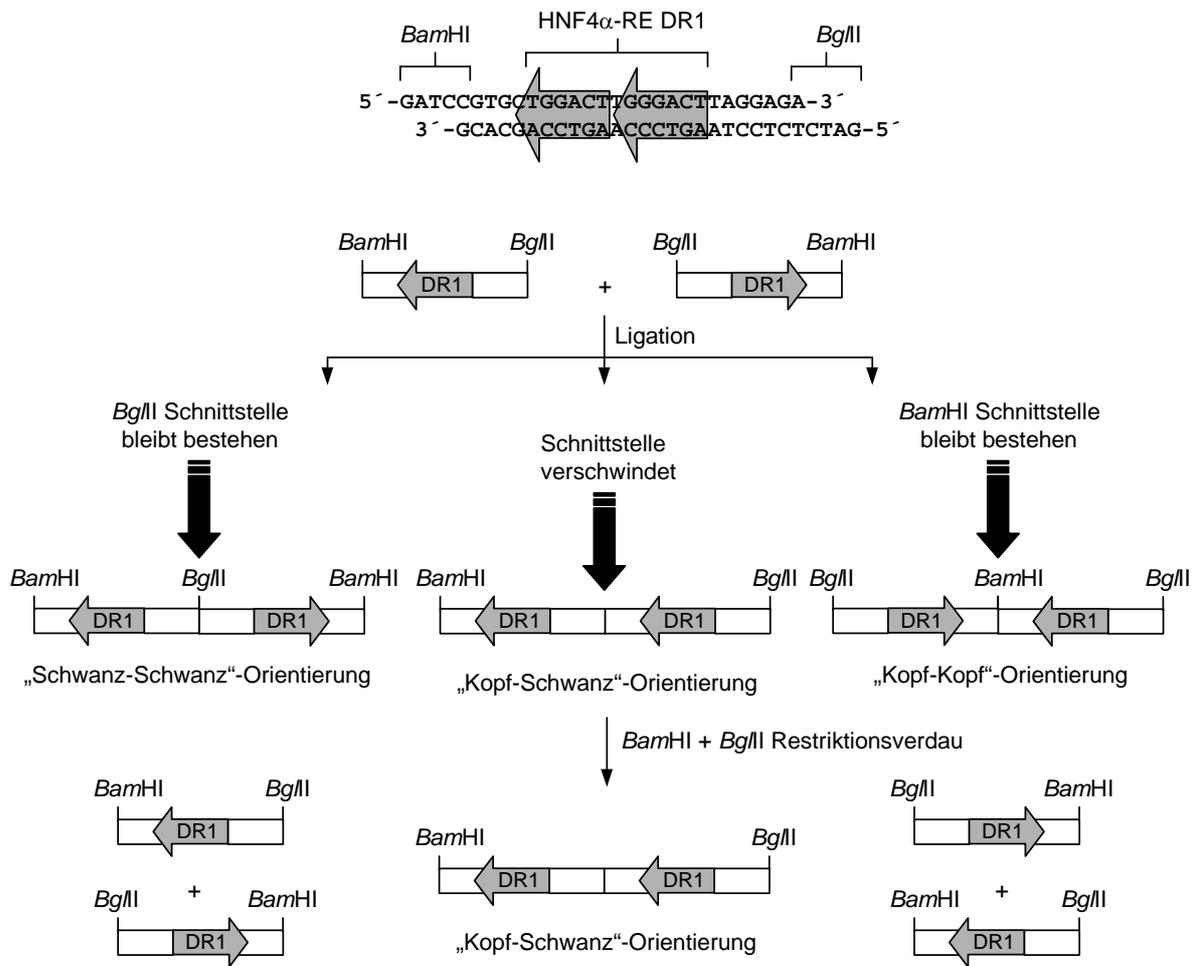


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Generierung eines Dimers des HNF4α response elements.

Die beiden Einzelstrangoligonucleotide sind so gewählt, dass nach dem *annealing* das gewünschte HNF4α-RE mit einigen Nucleotidresten aus dem nativen Promotorkontext zur Linken und zur Rechten sowie mit *Bam*HI bzw. *Bgl*III-kompatiblen „vorgeschrittenen“ Restriktionserkennungssequenzen vorliegt. Die *response element* Monomere können bei der Ligation in den drei dargestellten Orientierungen ligiert werden, wobei die Schnittstelle zwischen den beiden Monomeren nur bei gleichsinniger Orientierung der DR1 Motive verloren geht. Durch gleichzeitigen Verdau mit *Bam*HI und *Bgl*III werden nach der Ligation die Reaktionsprodukte mit einheitlich korrekter Orientierung selektiert.

2.2.9.1 Phosphorylierung der Oligonucleotide

Zunächst wurden die beiden Oligonucleotide an den 5'-Termini phosphoryliert, um eine nachfolgende Multimerisierung durch Ligation der Monomerdoppelstränge zu ermöglichen. Der Reaktionsansatz bestand aus 2 µl 10 T4 PNK Puffer, 1 µl 100 pmol/µl Sense Oligonucleotid, 1 µl 100 pmol/µl Antisense Oligonucleotid, 5 µl 100 mM ATP, 9 µl Wasser und 2 µl 10 U/µl T4 Polynucleotidkinase. Er wurde 1 h bei 37°C inkubiert und die Polynucleotidkinase anschließend durch 10 min Inkubation bei 68°C inaktiviert.

2.2.9.2 Aufreinigung durch Phenol-Chloroform-Extraktion

Zu den 20 μl Reaktionsvolumen der Phosphorylierungsreaktion wurden 80 μl Wasser und danach 100 μl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben. Nach kräftigem Emulgieren durch 30 s Vortexen wurde 2 min bei 14000 Upm zentrifugiert, um die Phasen wieder zu trennen. Die wäßrige, obere Phase wurde vorsichtig und ohne Berührung der Interphase in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Dann wurden 400 μl 5 M Ammoniumacetatlösung (Endkonzentration 4 M), 5 μl 1 M Magnesiumchloridlösung (Endkonzentration 0,01 M) zur verbesserten Präzipitation von Oligonucleotiden und 5 μl 20 mg/ml Glykogen (Roche, Boehringer) (Endkonzentration 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ final) als *carrier* zur Co-Präzipitation zupipettiert, durch Vortexen kurz gemischt und schließlich durch Zugabe von 1000 μl Ethanol und 30 min Inkubation bei -20° die Oligonucleotide präzipitiert. Dann wurde das Präzipitat durch 20 min Zentrifugation bei 14000 Upm pelletiert, der Überstand verworfen, mit 500 μl 70% Ethanol gewaschen, 5 min bei 14000 Upm zentrifugiert und wiederum der Überstand verworfen. Anschließend wurde 1 min bei 14000 Upm trocken zentrifugiert, der restliche Überstand mit der Pipette abgenommen, das Pellet 15 min luftgetrocknet und in 12 μl 1 mM Tris-Cl pH 8,0; 300 mM NaCl resuspendiert.

2.2.9.3 Hybridisierung und Multimerisierung

Die phosphorylierten Oligonucleotide wurden durch 5 min Inkubation bei 90°C im Wasserbad und anschließend langsames Abkühlen (Abschalten des Heizelementes) hybridisiert, um ligierbare Doppelstränge zu erhalten. Dazu wurde zu den 12 μl hybridisierten Oligonucleotiden 1,5 μl $10\times$ Ligationspuffer und 1,5 μl T4 DNA Ligase zugegeben und über Nacht bei 15°C inkubiert. Danach wurde die Ligase durch 10 min Inkubation bei 68°C inaktiviert.

2.2.9.4 Selektion korrekter Ligationsprodukte

Die phosphorylierten, hybridisierten Oligonucleotide können prinzipiell in zwei verschiedenen Orientierungen ligiert werden, da die nach der Hybridisierung vorliegenden *Bam*HI- bzw. *Bg*III-Überhänge kompatibel sind. D.h. die Oligonucleotiddoppelstränge können in Kopf-Kopf-Orientierung (Sense-*Bam*HI-Überhang mit Sense-*Bam*HI-Überhang), in Schwanz-Schwanz-Orientierung (Antisense-*Bg*III-Überhang mit Antisense-*Bg*III-Überhang) oder in Kopf-Schwanz-Orientierung (Sense-*Bam*HI-Überhang mit Antisense-*Bg*III-Überhang) ligiert werden. Dasselbe gilt für die Ligation eines Oligonucleotidmonomers an bereits entstandene Oligonucleotiddimere, -trimere und höhere – multimeren. Da die Orientierung der Ligationsreaktion nicht beeinflusst werden kann, wurde das Produkt der Ligationsreaktion einem parallelen restriktionsendonucleolytischen Verdau mit *Bam*HI und *Bg*III unterworfen. Da bei einer Ligation in der gewünschten Kopf-Schwanz-Orientierung sowohl die *Bam*HI- als auch die *Bg*III-Erkennungssequenz verschwindet, bleiben beim Verdau mit *Bam*HI und *Bg*III also die gewünschten, korrekt orientierten Ligationsprodukte oder korrekt orientierte Multimerabschnitte in höheren Multimeren unverändert, wohingegen die unerwünschten

Ligationsprodukte mit Kopf-Kopf- oder Schwanz-Schwanz-Orientierung wieder in Oligonucleotidmonomere überführt werden oder partielle, unerwünschte Orientierungen in höheren Multimeren zerstört werden (Abbildung 3).

Nach der Ligationsreaktion wurden die Puffer- und Komponentenkonzentrationen wie in Tabelle 12 aufgeführt eingestellt.

Tabelle 12. Pufferbedingungen, Komponentenkonzentrationen und Volumina für selektiven Restriktionsverdau nach Ligation von *response element* Monomeren

Komponente	C _{nach Ligation} [in 15 µl]	C _{in 45 µl}	C _{Soll in 45 µl}	ΔC	Δn _{in 45 µl}	C _{Stamm}	+V _{Stamm}
Tris-Cl pH 7,5	~66 mM	~22 mM	50 mM	28 mM	1,26 µmol	0,5 M pH 8,0	2,52 µl
MgCl ₂	5 mM	1,66 mM	10 mM	8,33 mM	0,375 µmol	1 M	0,38 µl
Dithiothreitol	1 mM	0,33 mM	1 mM	0,66 mM	0,03 µmol	1 M	0,3 µl 100 mM
ATP	1 mM	0,33 mM	-	-	-	-	-
NaCl	300 mM	100 mM	100 mM	-	-	-	-

Zu 15 µl Ligationsprodukt wurden 2,52 µl 0,5 M Tris-Cl pH 8,0, 0,3 µl 1M MgCl₂, 0,3 µl 100 mM Dithiothreitol, 22,88 µl H₂O und 2,5 µl *Bam*HI und 1,5 µl *Bg*III zupipettiert und ein finales Reaktionsvolumen von 45 µl erhalten. Der Reaktionsansatz wurde 1,5 h bei 37°C inkubiert und anschließend im 4,5%igen SeaPlaque Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die verdauten, multimerisierten Ligationsprodukte wurden ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert.

2.2.9.5 Klonierung vor den Thymidinkinaseminimalpromotor

Um die multimerisierten Bindungsstellen vor den Thymidinkinaseminimalpromotors zu klonieren, wurde das Reporterplasmid pGL3-TK(-105), das den Bereich des Thymidinkinasepromotors von Nucleotid +51 bis -105 relativ zum Transkriptionsstart enthält, mit *Bg*III aufgeschnitten, wodurch zu den multimerisierten Oligonucleotiden kompatible Überhänge generiert wurden. Um eine Religation des geschnittenen Plasmids mit sich selbst zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatreste des Reaktionsproduktes mit Shrimps Alkalischer Phosphatase entfernt und das linearisierte, dephosphorylierte pGL3-TK(-105) Plasmid im Agarosegel analysiert und isoliert. Anschließend wurde die Klonierungsreaktion aus 1 µl 10× Ligationspuffer, 1 µl linearisiertes, dephosphoryliertes pGL3-TK(-105), 2 µl multimerisierte Oligonucleotide (Dimere, Trimere, Tetramere oder Pentamere), 5 µl H₂O und 1 µl T4 DNA Ligase angesetzt und bei 15°C über Nacht inkubiert. Die Ligationsprodukte wurde in *E.coli* TOP10F' transformiert, rekombinante Klone selektioniert und als Mini-Kultur vermehrt und Plasmidisolierung die Identität der Konstrukte durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

2.2.10 Zellkulturmethoden

2.2.10.1 Subkultivierung von Zellen

Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurde einmal mit 5 ml PBS gewaschen und nach Absaugen des PBS jeweils 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung auf die Platte pipettiert. Nach 5 bis 10 min Inkubation im Brutschrank wurden pro Platte 6 ml Medium zupipettiert, um den Verdau zu stoppen, und nach lockerem Schwenken der Platte zum Ablösen noch festsitzender Zellhaufen wurden die Zellen in ein 15 ml Falcontube überführt. Dann wurde 5 min bei 1000 Upm abzentrifugiert (Hettich Rotanta/S, 23%), der Überstand abgenommen und 10 ml frisches Medium zugegeben und das Zellpellet durch zehn bis fünfzehnmaliges Aufziehen und Ablassen mit der Pipette vollständig resuspendiert. Je nach gewünschter Verdünnung wurde ein entsprechendes Volumen in eine neue Zellkulturplatte pipettiert und mit Kulturmedium auf 10 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.

2.2.10.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellen wurden wie beim Subkultivieren behandelt und vor der Aussaat ein 50 µl Aliquot der Zellsuspension unter dem Umkehrmikroskop mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dazu wurde zunächst die Oberfläche der Zählkammer und das Deckglas mit 70% Isopropanol gereinigt und anschließend das Deckglas so auf der Kammer angebracht, dass die Tiefe der Zählkammer 0,1 mm betrug (Auftreten von Newton'schen Ringen). Dann wurde die Zellsuspension unter Ausnutzung der Kapillarkräfte in die Zählkammer gefüllt. Es wurden 2 bis 4 große Quadrate ausgezählt und der erhaltene Mittelwert zur Berechnung der Zellzahl pro ml mit 10000 multipliziert.

2.2.10.3 Kryokonservierung von Zellen

Zunächst wurden die Zellen wie bei der Subkultivierung abtrypsiniert, abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und anschließend in einem Mediumvolumen aufgenommen, so dass die doppelte finale Zellkonzentration in der Hälfte des gewünschten Endvolumens vorlag. Dann wurde unter Schütteln tropfenweise 2× Einfriermedium bis zum gewünschten Endvolumen zugegeben und jeweils 1ml in Kryokonservierungsröhrchen aliquotiert. In mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter wurden die Röhrchen 2 Tage bei -80°C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff verbracht.

2.2.10.4 Auftauen von kryokonservierten Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden aus dem Flüssigstickstoffbehälter entnommen und sofort im Wasserbad bei 37°C oder alternativ in der Hand aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcontube überführt und mit geeignetem Kulturmedium aufgefüllt und 5 min bei 1000 Upm (Hettich Rotanta/S, 23%) abzentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums zur Entfernung des Einfriermediums wurde in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellen in geeigneter Menge ausgesät (1×10^6 , 500000).

2.2.11 Transiente Transfektion von Säugerzellen

2.2.11.1 Vorbereitung der Zellen zur Transfektion

Die Aussaat der zu transfizierenden Zellen erfolgte 1 Tag vor der Transfektion. Die Zellen wurden wie bei der Subkultivierung abgelöst und ein 50 µl Aliquot in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Für die Transfektion von LS174T und HepG2 Zellen wurden 150000 Zellen pro well, für die Transfektion von COS-1 und HeLa Zellen 30000 Zellen pro well in 500 µl Kulturmedium pro well in 24-well Platten (BD Biosciences) ausgesät.

2.2.11.2 Transiente Transfektion mit Effectene™ Reagens

Bei den Transfektionen wurden jeweils 3 wells mit identischen Komplexen und Bedingungen, d.h. als Triplikate behandelt. Pro well wurden 200 ng DNA Komplexe transfiziert, bestehend aus jeweils 150 ng Reporterplasmid DNA, 20 ng pCMVβ β-Galactosidaseexpressionsplasmid DNA zur Kontrolle der Transfektionseffizienz und bis zu 30 ng Expressionsplasmid DNA für Transkriptionsfaktoren oder leeres Expressionsplasmid pcDNA3. Um jeweils gleiche Mengen an DNA zu transfizieren wurde gegebenenfalls mit pUC18 Plasmid ad 200 ng aufgefüllt.

Die DNA Gemische wurden pro well mit EC Puffer auf ein Volumen von 60 µl aufgefüllt, dann wurden jeweils 1,6 µl Enhancer zupipettiert und auf dem Vortex gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde kurz abzentrifugiert und pro well 2 µl Effectene™ Reagens zugegeben, 15 s gevortext und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation wurde das Medium der ausgesäten Zellen abgesaugt und durch 500 µl frisches Kulturmedium ersetzt. Dann wurden jeweils 200 µl Kulturmedium zu den Ansätzen pipettiert und nach Mischen durch mehrmaliges Pipettieren oder Invertieren der Tubes der Ansatz vorsichtig tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Abschließend wurde die Platte zur gleichmäßigen Verteilung der Komplexe vorsichtig geschwenkt. Die Zellen wurden 5 bis 7 Stunden mit den DNA Komplexen im Brutschrank bei 37°C inkubiert, danach wurde das Medium mit den Komplexen abgesaugt und durch 500 µl frisches, gegebenenfalls mit in DMSO gelösten Induktoren versetztes Medium ersetzt. Nach weiteren 24 h wurden das Medium erneut abgesaugt und 500 µl frisches Medium auf die Zellen gegeben.

2.2.11.3 Behandlung der transfizierten Zellen mit Induktoren

Bei der Behandlung der transfizierten Zellen mit den Induktoren Dexamethason oder Rifampicin wurde Medium ohne Phenolrot verwendet. Das zur Supplementierung dieses Mediums verwendete foetale Kälberserum wurde mit dextranbeschichteter Aktivkohle behandelt, wodurch potentielle agonistische Effekte des Phenolrots und von im Kälberserum vorhandener Faktoren vermieden werden. Dexamethason und Rifampicin wurden als 1000× konzentrierte Stammlösungen in DMSO gelöst bei -20°C gelagert. Zur Behandlung wurde die jeweilige Stammlösung 1 zu 1000 im geeigneten

Kulturmedium verdünnt und von diesem jeweils 500 µl pro well auf die Zellen gegeben. Als Vehikelkontrolle wurde folglich 0,1% (v/v) DMSO in Kulturmedium verwendet (Lösemittelkontrolle). Beim Wechsel des Kulturmediums mit Induktoren wurde dieses abgesaugt, jedes well mit 500 µl PBS gewaschen und anschließend 500 µl frisches induktorhaltiges Medium zugegeben.

2.2.11.4 Behandlung von foetalem Kälberserum mit dextranbeschichteter Aktivkohle

2.2.11.4.1 *Bereitung der Dextran-Aktivkohle*

25 g Norit A Aktivkohle (Serva) wurden mit 200 ml 10 mM Tris-Cl pH 8,0 durch heftiges Schütteln im Plastikzentrifugationsgefäß gewaschen und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgossen und der Waschvorgang zweimal wiederholt. Schließlich wurde das Aktivkohlepellet in 200 ml 10 mM Tris-Cl pH 8,0 unter Zugabe von 25 g Dextran T70 (Pharmacia) resuspendiert. Nach dem Autoklavieren wurde die dextranbeschichtete Aktivkohle (DCC, Dextran coated charcoal) bei 4°C gelagert.

2.2.11.4.2 *Behandlung des Serums*

10 ml DCC Suspension wurden zu 500 ml foetalem Kälberserum gegeben und über Nacht bei 4°C gerührt. Die Suspension wurde dann 20 min bei 4°C und 16000g (GSA-Rotor, 10000 Upm) zentrifugiert. Dem Überstand wurden weitere 10 ml DCC Suspension zugesetzt, dann wurde 30 min lang bei 50°C inkubiert und danach auf 4°C abgekühlt. Nach erneutem Abzentrifugieren für 20 min bei 10000 Upm und 4°C wurden nochmals 10 ml DCC Suspension zum Überstand zugegeben, wieder 30 min bei 50°C inkubiert, auf 4 °C abgekühlt und ein letztes Mal 20 min bei 4°C und 10000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde durch 0,45 µm Filter vorfiltriert und anschließend durch 0,2 µm Nalgene-Filter steriltriftriert. Das mit dextranbeschichteter Aktivkohle-behandelte foetale Kälberserum (DCCT-FCS, dextran coated charcoal treated fetal calf serum) wurde dann in 50 ml Aliquots bei –20°C gelagert.

2.2.11.5 Reporterassays

2.2.11.5.1 *Präparation der Zellextrakte*

48 h nach der Transfektion wurde das Kulturmedium abgenommen und jedes well zweimal mit 1× PBS gewaschen. Danach wurden zur Lyse der Zellen 150 µl 1× Passive Lysis Buffer (Promega) in jedes well gegeben und die Platte 20 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen mit der Pipette wurden die Zellysate anschließend gemischt und in 96-well Platten überführt. Anschließend wurde der Zelldebris durch 3 min Zentrifugation bei 1800 g (Hettich Universal 32, 4000 Upm) pelletiert und die Platten bis zur weiteren Verwendung auf Eis oder im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.2.11.5.2 Messung der Luciferase- und β -Galactosidaseaktivität

Die Luciferaseaktivitäten und β -Galactosidaseaktivitäten wurden im AutoLumat *Plus* (Berthold Technologies) bestimmt. Für Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden 20 μ l des Zellextraktes, für die Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität 10 μ l des Zellextraktes in Meßröhrchen (Sarstedt #55478, 4 ml) vorgelegt. Die Zeit- und Volumenparameter der Assays sind in Tabelle 13 aufgeführt. Die gemessenen Luciferaseaktivitäten wurden zur Berücksichtigung der Transfektionseffizienz durch die gemessenen β -Galactosidaseaktivitäten dividiert.

Tabelle 13. Meßparameter für Luciferase- und β -Galactosidase-Reporterassays

	Luciferase-Assay	β -Galactosidase-Assay
V _{Zellextrakt} [μ l]	20	10
Start der Reaktion	+ 300 μ l Reaktions-Injektions-Mix+	+ 100 μ l β -Galactosidase-Assay-Puffer
Inkubationszeit [min]	-	30
Meßdauer [s]	4	5
Reaktionsstopp	-	+ 100 μ l β -Galactosidase-Stopplösung

2.2.12 Electrophoretic mobility shift assay

Beim *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) wird die Tatsache ausgenutzt, daß die Wanderungsgeschwindigkeit von Oligonucleotiden im Polyacrylamidgel aufgrund der Größenzunahme verringert ist, wenn diese als Komplex mit DNA-bindenden Proteinen gebunden vorliegen. Auf diese Weise kann die Bindung eines bestimmten Proteins oder eines Proteins aus einem Gemisch an eine bestimmte Oligonucleotidsequenz *in vitro* bewiesen werden.

2.2.12.1 Radioaktive Markierung des Oligonucleotids

2.2.12.1.1 Hybridisierung der Einzelstrang-Oligonucleotide

Zunächst wurden die beiden komplementären DNA-Oligonucleotide hybridisiert, um den proteinbindungsfähigen DNA-Doppelstrang mit dem gewünschten Bindungsmotiv zu generieren. Hierzu wurden jeweils 10 μ l einer 100 μ M Lösung der beiden einzelsträngigen DNA-Oligonucleotide zu 10 μ l 10 \times Klenow Puffer und 170 μ l H₂O pipettiert und 5 min bei 95°C auf der Heizplatte inkubiert. Danach wurde die Lösung langsam abgekühlt, so dass sich die korrekten Doppelstränge bilden konnten.

Tabelle 14. Oligonuceotide für *response elements* für *electrophoretic mobility shift assays*

<i>Response Element</i>		Sequenz
HNF4 α -RE / PXR 'HNF4 α -RE'	Sense	5' -GATCCGTGCTGGACTTGGGACTTAGGAGA-3'
	Antisense	5' -GATCTCTCCTAAGTCCCAAGTCCAGCACG-3'
Mutiertes HNF4 α -RE / PXR 'HNF4 α -REmut'	Sense	5' -GATCCGTGCTGGTTTTGGGTTTTTAGGAGA-3'
	Antisense	5' -GATCTCTCCTAAAACCCAAAACCAGCACG-3'
HNF4 α -RE / ApoCIII 'ApoCIII DR1'	Sense	5' -GATCCAGGTGACCTTTGCCAGCGA-3'
	Antisense	5' -GATCTCGCTGGGCAAAGGTCACCTG-3'
COUP-TF-RE / MDR1 'MDR1 DR4'	Sense	5' -GATCCTCATTGAACTAAGTTGACCTTGCTCCA-3'
	Antisense	5' -GATCTGGAGCAAGGTCAAGGTAGTTCAATGAG-3'

2.2.12.1.2 Radioaktive Markierung

Die radioaktive Markierung des Doppelstrangoligonucleotids erfolgte mit dem Klenow-Fragment. Dazu ein Ansatz aus 2 μ l des doppelsträngigen Oligonucleotids (10 pmol), 5 μ l 10 \times Klenow Puffer, 2,5 μ l [α^{32} P]-dCTP, 5 μ l 2 mM d(GAT)TP-Mix, 34,5 μ l H₂O und 1 μ l 2 U/ μ l Klenow-Fragment pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert.

2.2.12.1.3 Abtrennung nicht inkorporierter Radioaktivität

Die nicht inkorporierte Radioaktivität wurde vom radiomarkierten Oligonucleotid durch Gelfiltration mit ProbeQuant™ G-50 Micro Columns (Amersham Biosciences) abgetrennt. Zur Vorbereitung der Säulchen wurde die Matrix der Säulchen zunächst durch sanftes Vortexen resuspendiert. Nach Aufdrehen des Deckels um 90° und Entfernen der Schutzkappe am Säulenende wurde das Bett des Säulchens durch 1 min Zentrifugation bei 735 g präpariert. Die aufzureinigende Lösung wurde vorsichtig auf die schräge Oberfläche der gepackten Matrix der Säule gegeben und dann 2 min bei 735 g zentrifugiert und das gereinigte Oligonucleotid im Auffanggefäß als Eluat gewonnen.

2.2.12.2 *In vitro* Transkription und Translation von DNA-bindenden Faktoren

Die Herstellung der DNA-bindenden Faktoren wurde mit dem TNT Quick Coupled Transcription/Translation Kit (Promega) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Der TNT Quick Master Mix wurde mit der Hand zügig aufgetaut und anschließend der Reaktionsansatz bestehend aus 40 μ l TNT Quick Master Mix, 1 μ l 1 mM Methionin, 2 μ l Plasmidmatrize und 7 μ l RNase-freies Wasser sofort auf Eis pipettiert. Der nicht benötigte TNT Quick Master Mix wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und der Reaktionsansatz bei 30°C für 1,5 h inkubiert und anschließend bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.2.12.3 Präparation von Kernextrakten aus kultivierten Zelllinien

Die Präparation von Zellkernextrakten aus Zelllinien als Proteinfraktion für *electrophoretic mobility super shift* Experimente wurde nach einer modifizierten Methode von Neurath et al. (Neurath, 1997) durchgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis, im Kühllabor und in gekühlten Zentrifugen durchgeführt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit dem Gummischaber abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml eiskaltem Puffer A gewaschen. Nach 5 min Zentrifugation bei 750 g (2800 Upm, Biofuge 13, Heraeus) und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Puffer A + 0,4% Nonidet-P40 resuspendiert. Nach 10 min Inkubation wurde wie oben 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Kernpellet in ungefähr 5 Volumina (100 bis 1000 µl) eiskaltem Puffer B resuspendiert. Nach Zugabe eines Minimagnetührstäbchens wurde 30 min im Kühlschrank gerührt. Anschließend wurde 15 min bei 9000 Upm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen, aliquotiert und nach Bestimmung der Proteinkonzentration bei –80°C gelagert.

2.2.12.4 Proteinbestimmung der Kernextrakte

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der präparierten Kernextrakte wurde nach Smith durchgeführt. Die Meßproben wurden 1 zu 5 bzw. 1 zu 20 vorverdünnt und jeweils 10 µl der Vorverdünnung als Doppelwerte in 96-well Mikrotiterplatten vorgelegt. Dann wurden jeweils 200 µl Reagens (1 Teil 4% Cu(II)-Sulfat + 49 Teile Bicinchoninsäure, Sigma) zupipettiert, kurz vorsichtig geschüttelt und anschließend 1 h im Trockenschrank bei 37°C inkubiert. Danach wurde innerhalb von 30 min die Extinktion bei der Wellenlänge 570 nm im VICTOR™ 1420 Multilabel Counter (Wallac) gemessen. Als Kalibrierproben für die Proteinbestimmung wurden Rinderserumalbuminlösungen der Konzentrationen 1000, 800, 600, 400 und 200 µg/ml in Wasser verwendet.

2.2.12.5 Polyacrylamidgelelektrophorese und Detektion

Zunächst wurde ein 5%iges Polyacrylamidgel/0,5×TBE aus 5 ml Acryl-amid/Bisacrylamidlösung, 1,5 ml 10×TBE, 23,5 ml H₂O, 30 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin und 300 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat hergestellt. Die auf dem Gel zu trennenden Inkubationen wurden in einem Endvolumen von 20 µl durchgeführt. Für EMSA Experimente mit *in vitro*-synthetisiertem Protein wurden dazu 10 µl 2× Ladepuffer, 2 µl 10 µM NS-Oligo, 2 µl *in vitro*-Proteinsynthesereaktionsprodukt und H₂O ad 19 µl in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Bei EMSA Experimenten, bei denen Kernextrakte als Proteinfraktion verwendet wurden, wurden statt des *in vitro*-Proteinsyntheseprodukts 5 µg Kernextraktprotein verwendet und anstelle des NS-Oligos 2 µl 1 µg/µl poly(dI-dC) als unspezifischer DNA-Doppelstrangkompetitor, jeweils unter Anpassung des Wasserrestvolumens, verwendet.

Bei Konkurrenzexperimenten wurde zusätzlich 1 µl nicht radioaktiv markiertes Kompetitoroligonucleotid und bei *super shift* Experimenten zusätzlich 1 µl Antikörperlösung

zupipettiert und das Wasservolumen entsprechend verringert. Nach 15 min Vorinkubation auf Eis bzw. nach 30 min Vorinkubation bei Raumtemperatur bei *super shift* Experimenten wurde 1 μ l radiomarkiertes Oligonucleotid (50000 cpm/ μ l) dazupipettiert und nach weiteren 20 min Inkubation auf Eis die Proben vorsichtig auf das Gel beladen, welches zuvor einem Vorlauf von 30 min bei 200 V unterworfen worden war. Die Gelelektrophorese wurde im Kühllabor durchgeführt und nach 2,5 h beendet. Anschließend wurde das Gel mit einem Whatman-Papier von der Glasplatte abgenommen und mindestens 30 min bei 80°C im Geltrockner (Gel Dryer Model 583, Bio-Rad) getrocknet. Die Signaldetektion erfolgte durch Exposition von BAS-MS 2325 Imaging Plates (Fuji) mit dem getrockneten Gel für 1 bis 2 Tage und anschließendem Auslesen der Imaging Plates mit einem BAS-1800 II Image Reader (Fuji).

3 ERGEBNISSE

3.1 Expression von Cytochrom P450 3A4 und dem Pregnan-X-Rezeptor

Es ist bekannt, dass die Expression des Cytochrom P450 3A4 interindividuell sehr variabel sein kann, (Guengerich et al., 1991; Shimada et al., 1994; Watkins, 1994), über das Ausmaß der interindividuellen Variabilität der Expression des Pregnan-X-Rezeptors waren noch keine systematischen Untersuchungen durchgeführt worden. Daher wurde die Expression beider Gene in am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut vorhandenen Gewebebanken von Lebergewebe und Darmgewebe untersucht. Die Analyse der Expression in Leber erfolgte für CYP3A4 auf der Ebene der Proteinexpression und der mRNA-Expression, für den Pregnan-X-Rezeptor wurde lediglich die mRNA Expression bestimmt, da in Pilotexperimenten mit keinem der verwendeten Antikörper befriedigende Resultate erzielt werden konnten. Die Analyse im Darm erfolgte für CYP3A4 und PXR durch Bestimmung der mRNA Expression.

3.1.1 Expression von Cytochrom P450 3A4 und dem Pregnan-X-Rezeptor in der Leber

3.1.1.1 Cytochrom P450 3A4 Proteinexpression in der Leber

Die Proteinexpression von Cytochrom P450 3A4 wurde in der mikrosomalen Fraktion von 94 Lebergewebeproben durch Immunoblotting bestimmt. Die *Western Blots* sind in Abbildung 31 im Anhang dargestellt. Die individuellen CYP3A4 Expressionsdaten sind in Tabelle 16 im Anhang aufgeführt. In Tabelle 15 sind einige statistische Kenndaten wie das durchschnittliche Alter, die durchschnittliche CYP3A4 Proteinexpression sowie die Minima, Mediane und Maxima der Expression des gesamten Kollektivs aller 94 Patienten sowie der Subkollektive mit und ohne regelmäßige präoperative Medikation sowohl getrennt nach Geschlechtern als auch beider Geschlechter gemeinsam dargestellt.

Die Proteinexpression von CYP3A4 erstreckte sich im Kollektiv aller 94 Patienten über den Bereich von 6,0 pmol/mg bis 295 pmol/mg, die Variabilität belief sich damit auf einen Faktor von ungefähr 50. In der Kontrollgruppe ohne regelmäßige präoperative Medikation lag die Expression zwischen 6,6 pmol/mg und 187 pmol/mg, was einem Faktor von ungefähr 28 entspricht. Im Vergleich lag die Expression von CYP3A4 Protein in der Kontrollgruppe mit durchschnittlich 55,8 pmol/mg deutlich, jedoch nicht signifikant ($P > 0,05$) unter der durchschnittlichen Expression der Gruppe mit regelmäßiger präoperativer Medikamenteneinnahme von 79,3 pmol/mg.

Tabelle 15. Statistische Kenndaten zum Alter und zur hepatischen CYP3A4 Proteinexpression des gesamten Patientenkollektivs und der Kontroll- und Medikamentengruppe der Lebergewebebank.

Patientengruppe	m / w	N	Alter	CYP3A4 Protein	Min	Median	Max
			[a] MW ± SD	[pmol/mg] MW ± SD			
Alle Patienten	m	48	54,9 ± 16,7	46,4 ± 54,6	6,0	27,9 [‡]	245
	w	46	59,6 ± 14,4	93,8 ± 71,3	16,8	64,0 [‡]	295
	m + w	94	57,2 ± 15,7	69,6 ± 67,4	6,0	44,0	295
Gruppe ohne Prämedikation (Kontrollgruppe)	m	23	49,4 ± 20,1	33,5 ± 23,0 [†]	6,6	24,9	83
	w	16	49,8 ± 16,9	87,8 ± 52,1 [†]	16,8	76,8	187
	m + w	39	49,6 ± 18,6 [§]	55,8 ± 45,9 [¶]	6,6	44,0	187
Gruppe mit Prämedikation	m	25	59,8 ± 11,3	58,2 ± 71,1	6,0	32,0 [‡]	245
	w	30	65,0 ± 9,3	97,0 ± 80,3	20,3	57,4 [‡]	295
	m + w	55	62,6 ± 10,5 [§]	79,3 ± 78,1 [¶]	6,0	45,2	295

Statistische Signifikanzen für Vergleiche von Patientengruppen:

*P < 0.0001 (Mann-Whitney test); †P = 0.0003 (t-test); ‡P = 0.005 (Mann-Whitney test); §P < 0.0001 (t-test); ¶nicht signifikant

Dagegen war das Durchschnittsalter der Patienten der Kontrollgruppe signifikant geringer als das der Patienten der Medikamentengruppe (P < 0,0001). Der Normalverteilungstest nach Kolmogorov und Smirnov ergab, dass keine Normalverteilung der CYP3A4 Proteinexpression vorlag (KS Distanz 0,21; p = 0,0007). Der optische Eindruck legt eher eine trimodale Verteilung nahe (Abbildung 4). Durch die im Histogramm vorgenommene farbliche Unterteilung der Individuen in Mitglieder der Kontrollgruppe und Mitglieder der Medikamentengruppe ist zu erkennen, dass die Abweichung der Verteilung von der Gauss'schen Normalverteilung möglicherweise auf Induktionsereignisse bei Individuen aus der Medikamentengruppe zurückzuführen ist, da die Messwerte der Kontrollgruppe alleine nach dem Kolmogorov und Smirnov-Test normalverteilt sind (KS Distanz 0,19; P > 0,10).

Da das durchschnittliche Alter der Patienten der Medikamentengruppe signifikant höher ist als das der Kontrollgruppe und bisherige Untersuchungen über den Einfluss des Alters auf den Fremdstoffmetabolismus allgemein und im speziellen auf die Expression und Funktion des Cytochrom P450 3A4 unterschiedliche Resultate zeigten (Hunt et al., 1992; George et al., 1995), wurde überprüft, ob die CYP3A4 Proteinexpression im untersuchten Kollektiv durch das Patientenalter beeinflusst ist. Eine Korrelationsanalyse mit der CYP3A4 Proteinexpression und dem Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation bzw. Gewebeentnahme ergab jedoch keinen signifikanten Zusammenhang der beiden Variablen (N = 94; r_s = 0,06; P = 0,56) (Abbildung 5). Auffallend ist jedoch, dass vor allem im Altersbereich ab ungefähr 35 Jahre vermehrt sehr hohe CYP3A4 Proteinexpressionslevels von 150 pmol/mg Protein und mehr auftreten. Von den 11 Patienten mit einem Expressionsniveau über 150 pmol/mg waren jedoch 9 Mitglieder der Medikamentengruppe und hatten zum Teil bekannte CYP3A4

Induktoren und/oder Substrate (1×Johanniskrautextrakt, 2×Carbamazepin, 2×Nifedipin, 1×Bromazepam) als Medikation bekommen. Weiterhin hatte keiner der wenigen unter 35 Jahre alten Patienten eine regelmäßige präoperative Medikation eingenommen. Ein Einfluss des höheren Durchschnittsalters der Medikamentengruppe auf die ebenfalls höhere CYP3A4 Proteinexpression scheint somit insgesamt unwahrscheinlich.

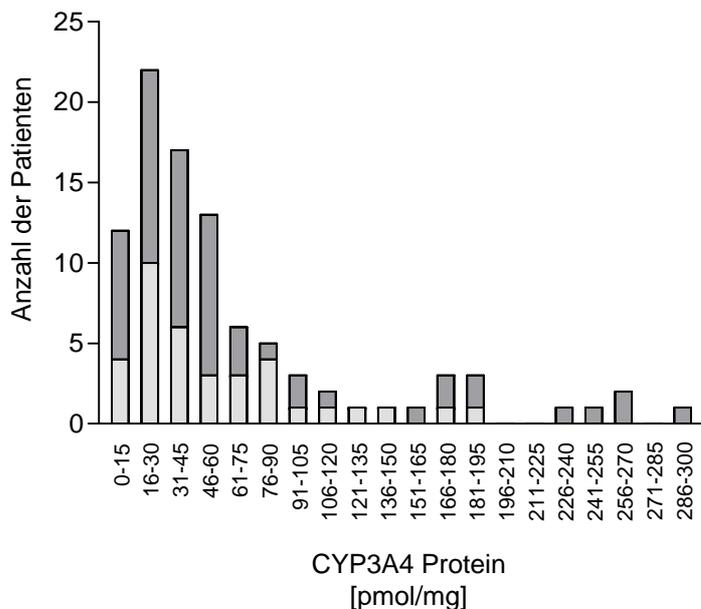


Abbildung 4.

Histogramm der CYP3A4 Proteinexpression in der mikrosomalen Fraktion von Lebergewebe von 94 Patienten. Hellgraue Säulen: Patienten der Kontrollgruppe ohne regelmäßige präoperative Medikamenteneinnahme (N=39). Dunkelgraue Säulen: Patienten aus der Gruppe mit regelmäßiger präoperativer Medikamenteneinnahme (N=55).

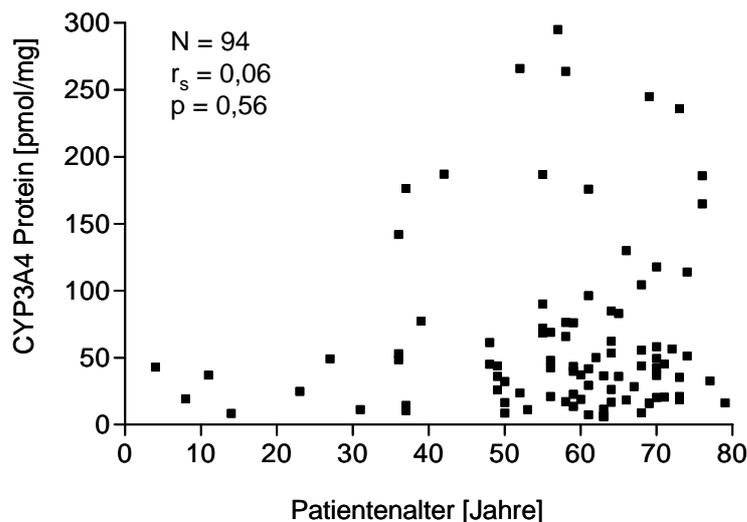


Abbildung 5.

Korrelation zwischen CYP3A4 Proteinexpression in der mikrosomalen Fraktion von Lebergewebe und Patientenalter von 94 Patienten.

3.1.1.2 Cytochrom P450 3A4 mRNA Expression in der Leber

Die Bestimmung der Cytochrom P450 3A4 mRNA Expression wurde mittels quantitativer Reverser Transkription-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) mit Gesamt-RNA durchgeführt. Die gemessenen Expressionsniveaus wurden auf das Expressionsniveau der 18S rRNA der jeweiligen Probe normalisiert. Das Expressionsniveau von CYP3A4 mRNA schwankte innerhalb des gesamten Kollektivs von 94 Patienten ungefähr um den Faktor 55, was mit der beobachteten Variabilität der CYP3A4 Proteinexpression im Einklang steht. Die mRNA Expressionswerte sind als relative Expressionsniveaus bezogen auf Patient #47, welcher die geringste Expression aufwies, in Tabelle 16 im Anhang aufgeführt.

3.1.1.3 Pregnan-X-Rezeptor mRNA Expression in der Leber

Zunächst war versucht worden, die Proteinexpression des Pregnan-X-Rezeptors mittels *Western Blotting* zu analysieren, es konnten jedoch mit keinem der verwendeten Antikörper akzeptable Ergebnisse erzielt werden. Daher wurde die Expressionsanalyse des Pregnan-X-Rezeptors auf die Bestimmung der mRNA Expression beschränkt. Die mRNA Expression von PXR wurde ebenfalls mittels qRT-PCR mit Gesamt-RNA bestimmt. Die gemessenen Expressionsniveaus wurden auf das Expressionsniveau der 18S rRNA der jeweiligen Probe normalisiert. Das Expressionsniveau der PXR mRNA variierte innerhalb der gesamten Population von 94 Patienten um einen Faktor von ungefähr 17. Die individuellen mRNA Expressionsniveaus, relativ zum Patienten #112 mit der geringsten Expression, sind in Tabelle 16 gezeigt.

3.1.1.4 Zusammenhang zwischen Cytochrom P450 3A4 Protein, mRNA und PXR mRNA Expression und geschlechtsspezifische Unterschiede der Expression

Neben posttranskriptionellen Mechanismen wie einer Stabilisierung der mRNA durch Clotrimazol (Eliasson et al., 1994) und posttranslationalen Mechanismen wie einer Stabilisierung von CYP3A Protein durch Troleandomycin führt die Mehrzahl der CYP3A Induktoren, wie z.B. Dexamethason und Rifampicin, vor allem durch transkriptionelle Aktivierung zu einer erhöhten Expression. Diese Aktivierung der Transkription wird im allgemeinen durch Kernrezeptoren wie z.B. den Glucocorticoidrezeptor, den Pregnan-X-Rezeptor oder den *Constitutive Androstane Receptor* vermittelt. Daher wurde durch Korrelationsanalysen überprüft, ob Zusammenhänge zwischen der CYP3A4 Proteinexpression, der CYP3A4 mRNA Expression und der PXR mRNA Expression bestehen. Tatsächlich bestand eine signifikante Korrelation zwischen der CYP3A4 Protein- und der mRNA Expression im gesamten Kollektiv aller 94 Patienten ($N=94$; $r_s=0,60$; $P<0,0001$) (Abbildung 6) wie auch in der Kontrollgruppe ($N=39$; $r=0,52$; $P=0,0007$). Weiterhin wurde eine signifikante Korrelation zwischen der mRNA Expression von CYP3A4 und der mRNA Expression des Pregnan-X-Rezeptors aller 94 Patienten gefunden ($N=94$; $r=0,70$; $P<0,0001$). Diese Korrelation war sogar noch

stärker, wenn man nur die Individuen der Gruppe ohne Prämedikation betrachtet (N=39; $r=0,81$; $P<0,0001$).

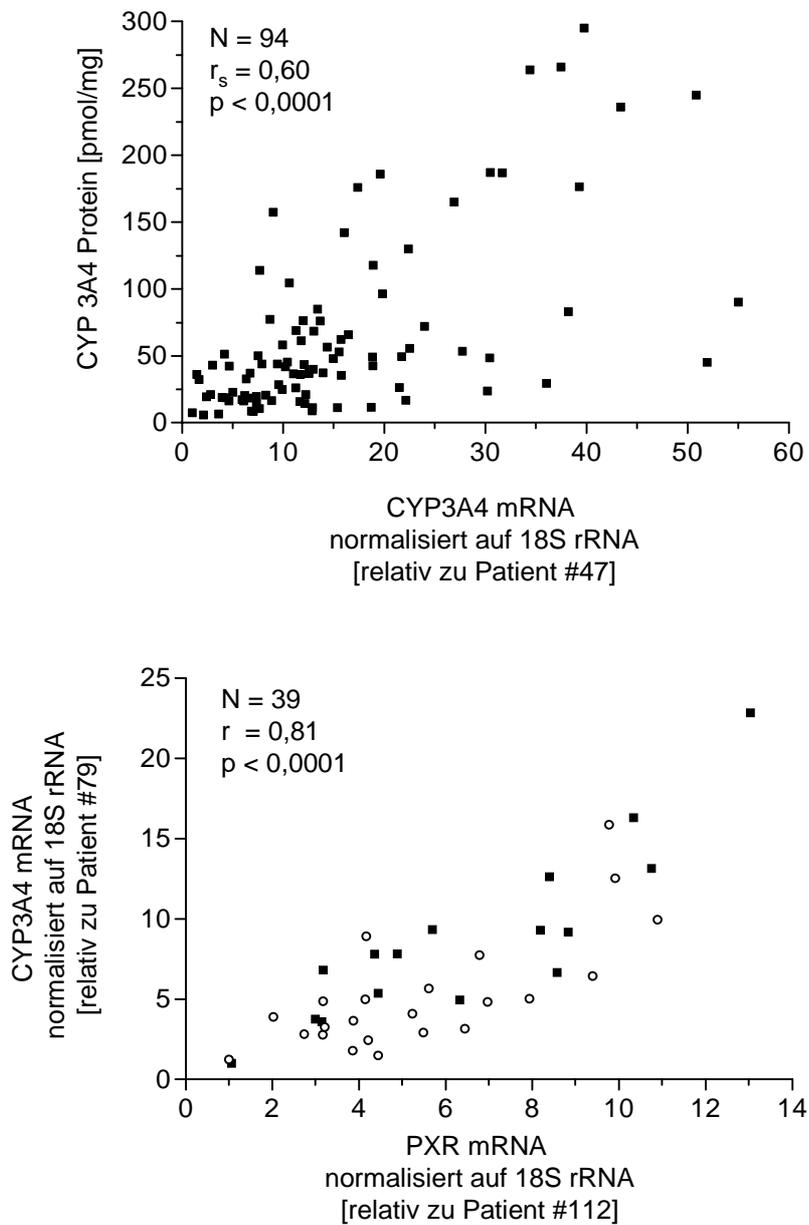


Abbildung 6.

Oben: Korrelation zwischen der CYP 3A4 mRNA Expression und der CYP3A4 Proteinexpression bei 94 Patienten der Lebergewebebank. Unten: Korrelation zwischen der PXR mRNA Expression und der CYP3A4 mRNA Expression in den 39 Patienten der Kontrollgruppe ohne Medikamenteneinnahme (offene Kreise: Männer; schwarze Quadrate: Frauen).

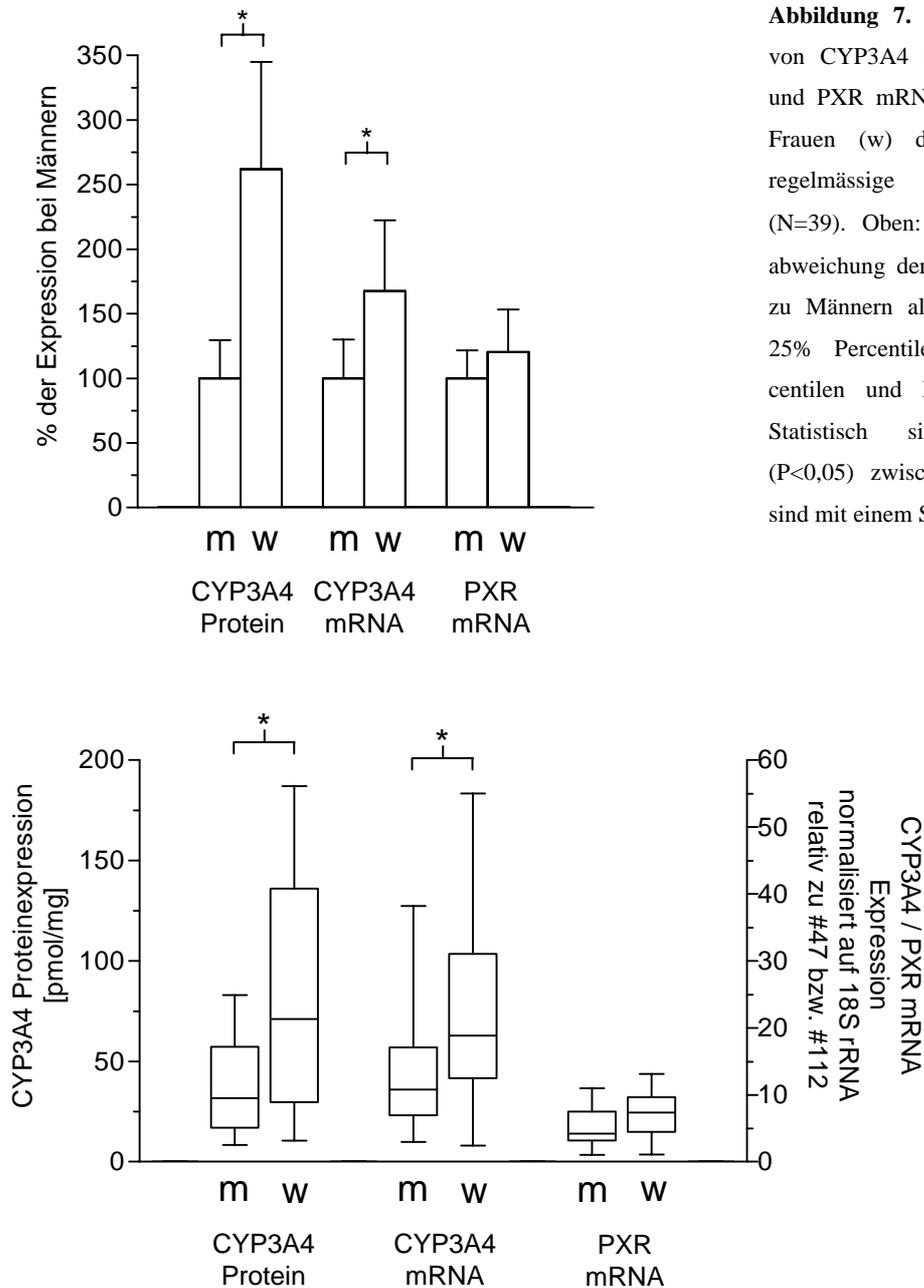
In mehreren Arbeiten wurde berichtet, dass bei der enzymatischen Aktivität von Cytochrom P450 3A4 und pharmakokinetischen Parametern, wie z.B. der Clearance einiger Pharmaka, die Substrate von CYP3A4 sind, ein geschlechtsspezifischer Dimorphismus vorliegt (Harris et al., 1995; Beierle et al., 1999; Tanaka, 1999; Meibohm et al., 2002).

Bei der Betrachtung der CYP3A4 Expression im untersuchten Kollektiv nach Geschlechtern getrennt zeigt sich, dass die Expression von CYP3A4 sowohl auf der Proteinebene (Tabelle 15) als auch auf Ebene der mRNA geschlechtsspezifisch signifikant unterschiedlich war. Im gesamten Patientenkollektiv betrug die durchschnittliche CYP3A4 Proteinexpression bei Männern 46,4 pmol/mg, bei Frauen hingegen 93,8 pmol/mg (Mann-Whitney test: $p < 0,0001$). In der Gruppe ohne Prämedikation, bei der eine mögliche Verzerrung der Daten durch präferentielle Induktion bei einem der Geschlechter nicht zu erwarten ist, war die durchschnittliche Expression bei Frauen mit 87,7 pmol/mg sogar um den Faktor 2,62 höher als die bei Männern mit 33,5 pmol/mg (t-test: $p = 0,0003$). In der Gruppe mit Prämedikation war dieser Geschlechtsdimorphismus mit 97 pmol/mg bei Frauen gegenüber 58,2 pmol/mg bei Männern nicht ganz so ausgeprägt aber immer noch beträchtlich und signifikant. (Mann-Whitney test: $P = 0,0047$).

Auch auf der Ebene der mRNA zeigte sich eine bei Frauen signifikant höhere durchschnittliche Expression von $21,16 \pm 13,01$ relativen Einheiten gegenüber $12,62 \pm 8,75$ relativen Einheiten bei Männern (t-test: $P = 0,019$) in der Kontrollgruppe. Im gesamten Kollektiv war die mRNA Expression bei Frauen mit $18,81 \pm 12,26$ relativen Einheiten ebenfalls signifikant höher als bei Männern mit durchschnittlich $13,41 \pm 11,22$ relativen Einheiten (Mann-Whitney test: $P = 0,0064$). In der Medikamentengruppe war die durchschnittliche CYP3A4 mRNA Expression bei Frauen mit $17,55 \pm 11,89$ relativen Einheiten immer noch höher als bei Männern mit $14,14 \pm 13,23$ relativen Einheiten, jedoch bestand keine statistische Signifikanz mehr (t-test: $P = 0,32$).

Im Gegensatz zur CYP3A4 Protein und mRNA Expression zeigte sich bei der PXR mRNA Expression kein geschlechtsspezifischer Unterschied. In der Kontrollgruppe war die PXR mRNA Expression bei Männern mit durchschnittlich $5,46 \pm 2,73$ relativen Einheiten zwar geringer als die bei Frauen mit $6,57 \pm 3,38$ relativen Einheiten, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (t-test: $P = 0,26$). In allen 94 Individuen (Männer: $5,46 \pm 3,20$ relative Einheiten; Frauen: $6,01 \pm 2,92$ relative Einheiten) wie auch in der Medikamentengruppe (Männer: $5,47 \pm 3,63$ relative Einheiten; Frauen: $5,72 \pm 2,67$ relative Einheiten) war der geschlechtsabhängige Unterschied vergleichbar gering oder noch geringer und jeweils statistisch nicht signifikant.

Im oberen Teil von Abbildung 7 sind die durchschnittlichen CYP3A4 Protein, mRNA und PXR mRNA Expressionsniveaus von Männern und Frauen der Kontrollgruppe in Prozent dargestellt, wobei die durchschnittliche Expression bei Männern jeweils auf 100% gesetzt wurde. Im unteren Teil von Abbildung 7 sind die Minima, Mediane, Maxima und 25%- und 75% Percentilen der CYP3A4 Protein-, mRNA und der PXR mRNA Expression von Männern und Frauen der Kontrollgruppe als *Box and Whiskers*-Diagramm dargestellt.



Obwohl also eine hohe Variabilität der Expressionsniveaus innerhalb der einzelnen Subgruppen des Kollektivs und innerhalb der Geschlechtergruppen bestand, ließ sich bei Frauen eine signifikant höhere durchschnittliche Expression von CYP3A4 Protein und mRNA, nicht aber von PXR mRNA feststellen.

3.1.2 Expression von Cytochrom P450 3A4 und dem Pregnan-X-Rezeptor im Darm

Die Expression von Cytochrom P450 3A4 mRNA und Pregnan-X-Rezeptor mRNA im menschlichen Darm wurde mit Gesamt-RNA von 24 Patienten aus einer Duodenalgewebebank bestimmt. Die gemessenen Expressionsniveaus wurden dabei auf die Expression des enterocytenspezifischen Haushaltsgens Villin normalisiert.

Die Expression des Cytochrom P450 3A4 mRNA variierte interindividuell um einen Faktor von 183, die Expression der PXR mRNA ungefähr um den Faktor sieben (Abbildung 8). Bei der Korrelationsanalyse zeigte sich, dass wie im Lebergewebe auch im Darmgewebe die beiden Expressionsniveaus signifikant korreliert waren, jedoch nicht so ausgeprägt wie in der Leber.

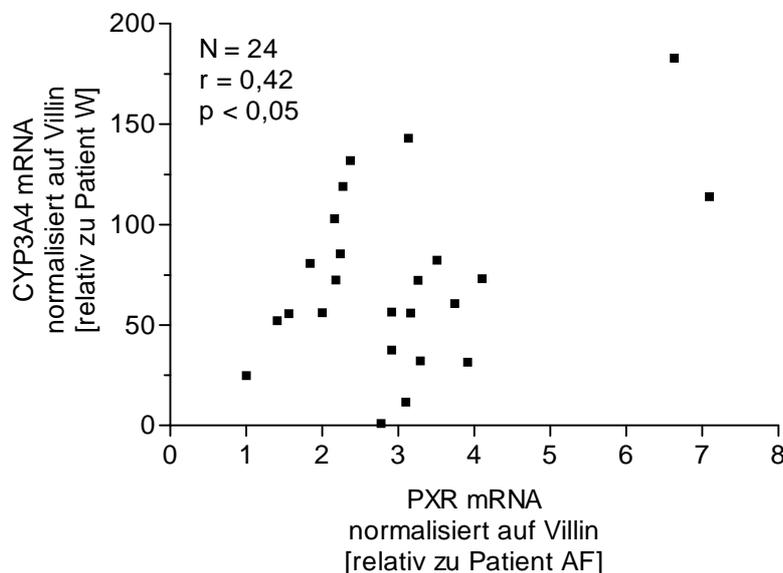


Abbildung 8.

Korrelation zwischen PXR mRNA Expression und CYP3A4 mRNA Expression in Duodenalgewebe von 24 Patienten.

3.2 Einfluss von Rifampicin auf die Expression von Cytochrom P450 3A4, MDR1 und des Pregnan-X-Rezeptors im Darm

Rifampicin induziert die Expression von Cytochrom P450 3A4 mRNA und Protein im menschlichen Darm (Kolars et al., 1992). Weiterhin war vor kurzem beschrieben worden, dass der Pregnan-X-Rezeptor nicht nur an der transkriptionellen Regulation von CYP3A4, insbesondere der Induktion von CYP3A4 durch Rifampicin, sondern auch an der des MDR1 Gens beteiligt ist (Geick et al., 2001).

Anhand von Dünndarmbiopsiegewebe aus einer Rifampicin-Digoxin-Interaktionsstudie (Greiner et al., 1999) sollte die Induktion von CYP3A4 und MDR1 auf mRNA Ebene überprüft werden. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob die Expression des die Induktion vermittelnden Pregnan-X-Rezeptors selbst durch Rifampicin beeinflusst wird und ob das individuelle Expressionsausmaß von PXR die Stärke der Induktion seiner Zielgene beeinflusst.

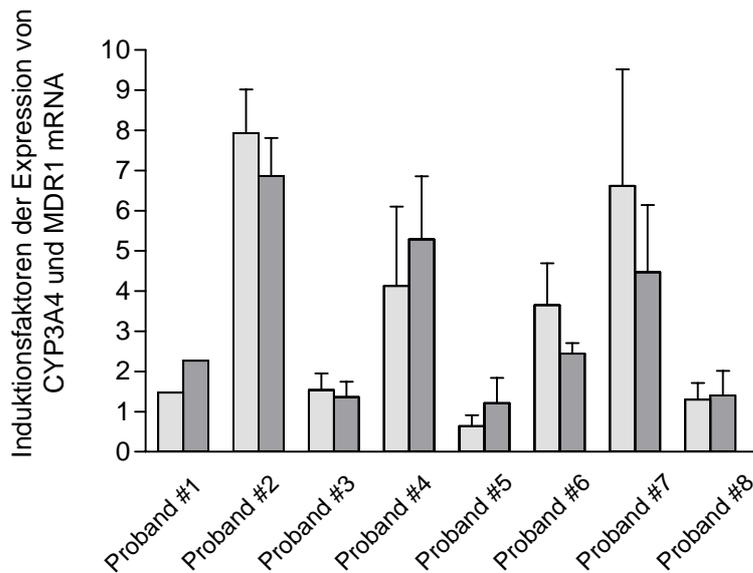


Abbildung 9.

Induktion der intestinalen Expression von CYP3A4 mRNA (hellgrau) und MDR1 mRNA (dunkelgrau) durch Rifampicin. Die mRNA Expression von CYP3A4 und MDR1 wurde mit Gesamt-RNA aus Duodenalbiopsien bestimmt, die vor und nach 8-tägiger oraler Einnahme von 600 mg Rifampicin entnommen worden waren.

Wie in Abbildung 9 zu erkennen ist, zeigte sich bei den Probanden #2, #4, #6 und #7 eine Induktion der CYP3A4 mRNA um einen Faktor von mehr als zwei, während bei den Probanden #1, #3, #5 und #8 keine oder nur eine schwächer als zweifache Induktion auftrat. Ein qualitativ sehr ähnliches Induktionsmuster ergab sich bei der MDR1 mRNA. Insgesamt zeigte sich also eine Co-Induktion der CYP3A4 und MDR1 mRNA durch Rifampicin. Besonders deutlich ist diese Korrelation zu erkennen, wenn man die individuellen CYP3A4 Induktionsfaktoren gegen die korrespondierenden MDR1 Induktionsfaktoren aufträgt ($r=0,91$; $P=0,0015$) (Abbildung 10). Die mRNA Expression des Pregnan-X-Rezeptors blieb von der Rifampicineinnahme weitgehend unbeeinflusst, die individuellen Quotienten aus der PXR mRNA Expression nach und vor Rifampicineinnahme bewegten sich zwischen minimal 0,5 und maximal 1,5.

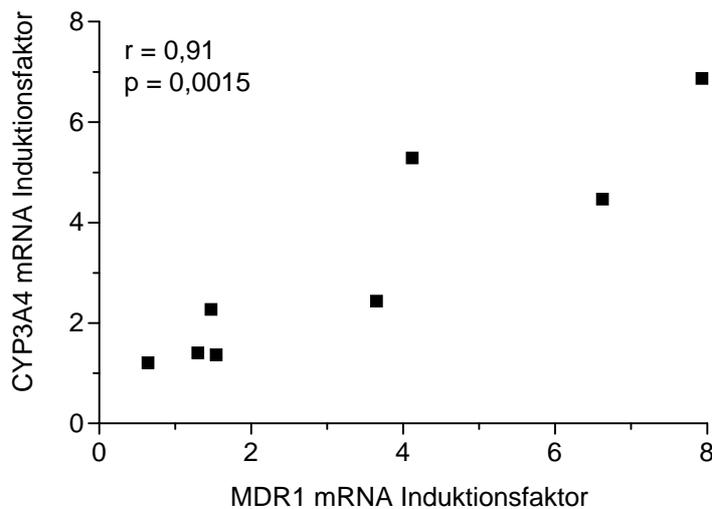


Abbildung 10.

Korrelation der individuellen CYP3A4 mRNA und MDR1 mRNA Induktionsfaktoren.

Um zu untersuchen, ob das Induktionsausmaß von CYP3A4 und MDR1 vom individuellen PXR mRNA Expressionsniveau abhing, wurden die Probanden retrospektiv in die zwei Gruppen von Induzierten, mit einem Induktionsfaktor >2 für CYP3A4 und MDR1 mRNA, und von Nicht- oder schwach Induzierten, mit einem Induktionsfaktor <2 für CYP3A4 oder MDR1 mRNA, eingeteilt. Für den Vergleich der beiden Gruppen wurden die beiden wenig variablen PXR mRNA Expressionswerte jedes Probanden vor und nach Rifampicineinnahme gemittelt.

Die PXR mRNA Expression war in diesem Kollektiv von 8 Probanden jedoch insgesamt nur relativ wenig variabel (Abbildung 11). Es bestand kein signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen PXR mRNA Expression zwischen der Gruppe der Nicht- oder schwach Induzierten und der Gruppe der Induzierten (t-test: $P=0,61$).

Setzt man hingegen das mRNA Expressionsniveau von CYP3A4 bzw. MDR1 vor der Einnahme von Rifampicin ins Verhältnis zum Ausmaß der Induktion durch Rifampicin, so zeigt sich, dass vor allem bei denjenigen Probanden eine gute Induktion erfolgte, deren mRNA Expressionsniveau vor Rifampicineinnahme relativ gering war (Abbildung 11). Im Falle von CYP3A4 besteht eine signifikante negative Korrelation zwischen der mRNA Expression vor Rifampicineinnahme und der Stärke der Induktion ($r=-0,81$; $P=0,03$). Bei der MDR1 Expression ist diese negative Korrelation zwar nicht signifikant, ein Trend scheint jedoch ebenfalls erkennbar zu sein ($r=-0,53$; $P=0,18$).

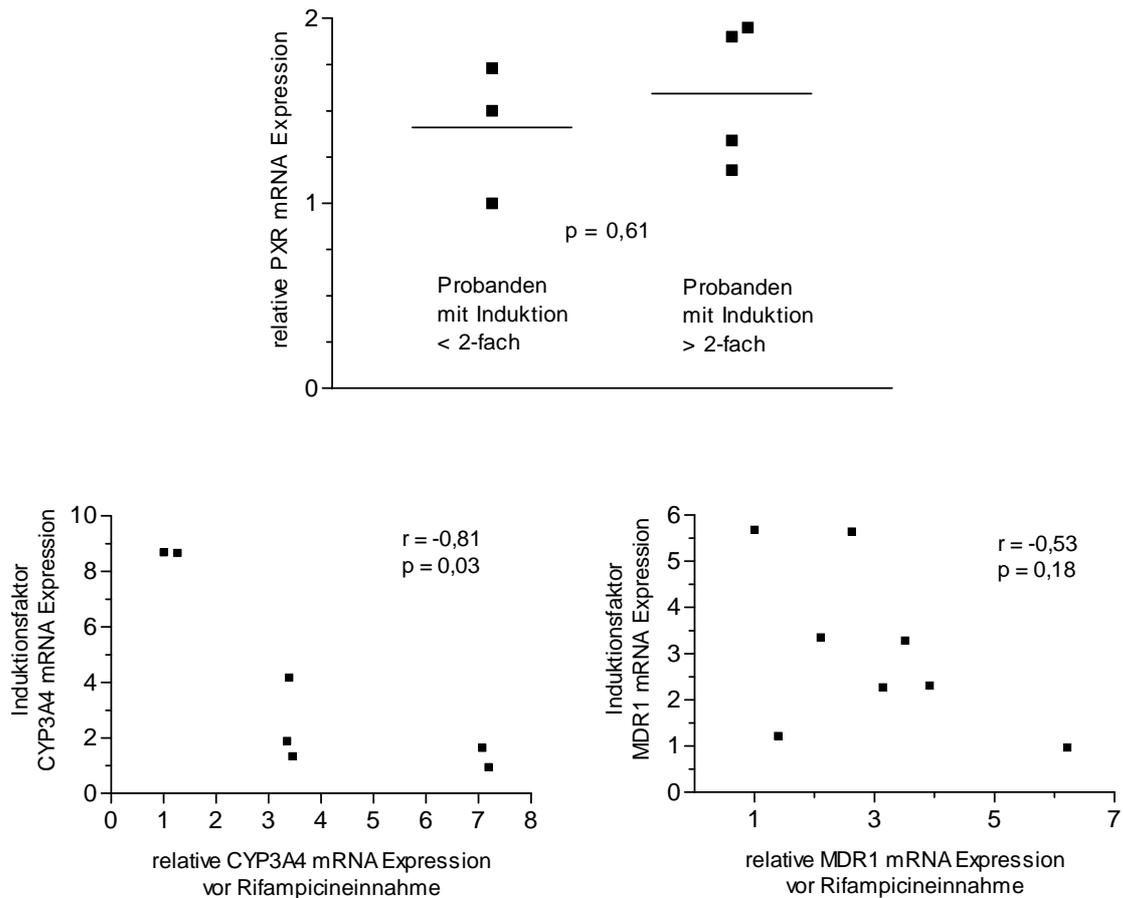


Abbildung 11.

Einfluss der individuellen PXR, CYP3A4 und MDR1 mRNA Expression auf die Induzierbarkeit. Oben: Vergleich der individuellen gemittelten PXR mRNA Expression der Probanden mit Induktionsfaktoren für CYP3A4 und MDR1 mRNA größer als zwei („Induzierte“) mit der PXR mRNA Expression der Probanden mit Induktionsfaktoren für CYP3A4 oder MDR1 geringer als zwei („Gering oder Nicht-induzierte“). Unten links: Korrelation zwischen individuellen CYP3A4 mRNA Expressionsniveaus vor Rifampicineinnahme und Induktionsfaktoren der CYP3A4 mRNA. Unten rechts: Korrelation zwischen individuellen MDR1 mRNA Expressionsniveaus vor Rifampicineinnahme und Induktionsfaktoren der MDR1 mRNA.

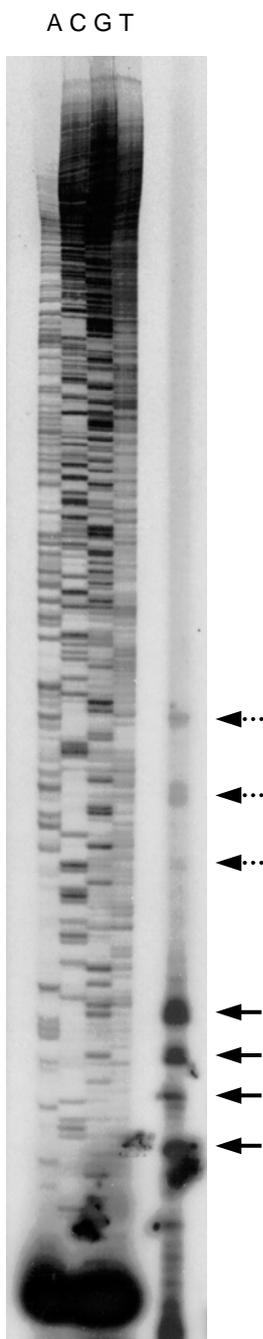
Zwar war die individuelle Induzierbarkeit der PXR Zielgene CYP3A4 und MDR1 nicht von der individuellen Expressionsstärke des Pregnan-X-Rezeptors abhängig. Da aber eine signifikante Korrelation zwischen der mRNA Expression von PXR und der des CYP3A4 existierte und die Expression des Pregnan-X-Rezeptors in menschlicher Leber und im Darm eine erhebliche interindividuelle Variabilität zeigte, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit daher eine Charakterisierung der 5' flankierenden Region des PXR Gens durchgeführt, um regulatorisch relevante *cis-acting* Elemente und *trans-acting* Faktoren zu identifizieren.

3.3 Charakterisierung der 5' flankierenden Region des PXR Gens

3.3.1 Bestimmung der Transkriptionsstartstelle des PXR Gens

In den Arbeiten über die Klonierung des Pregnan-X-Rezeptors aus cDNA Bibliotheken von menschlicher Leber (Blumberg et al., 1998; Lehmann et al., 1998) bzw. aus polyA⁺ RNA aus menschlicher Leber (Bertilsson et al., 1998) sind Sequenzinformationen über die 5' Enden der jeweils längsten klonierten cDNAs gezeigt. Die angegebenen 5' Termini unterscheiden sich jedoch beträchtlich, so liegt der von Blumberg et al. angegebene 5' Terminus mehr als 300 bp stromaufwärts

vom von Bertilsson et al. angegebenen 5' Terminus. Um die für die Charakterisierung der 5' flankierenden Region des PXR Gens notwendigen Promotor-Reporter-gen-Konstrukte herstellen zu können, musste dessen Transkriptionsstartstelle möglichst exakt lokalisiert werden. Aufgrund der beträchtlichen Unterschiede der publizierten Daten wurde eine experimentelle Identifizierung der Transkriptionsstartstelle des PXR Gens mittels *primer extension* und *RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' cDNA ends-polymerase chain reaction* durchgeführt.



3.3.1.1 Primer Extension

Zunächst wurde mit polyA⁺ RNA aus LS174T Zellen ein *primer extension* Experiment durchgeführt. Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, konnte kein eindeutiger 5' Transkriptterminus identifiziert werden, vielmehr sind neben mehreren schwächeren Banden, die auf Transkripte mit geringer Häufigkeit zurückzuführen sind, vier prominente Banden zu sehen. Deren Hauptintensitäten liegen an Positionen bei 82 bp, 87 bp, 91 bp und 97 bp stromabwärts von dem von Lehmann et al. angegebenen 5' Terminus (Abbildung 13). Eine exakte Zuordnung der 5' Transkriptenden ist dabei durch die hohe Signalintensität und durch Transkriptinitiation in unmittelbarer Nachbarschaft zur jeweiligen Hauptbande erschwert.

Abbildung 12. Bestimmung des Transkriptionsstarts von PXR mittels *Primer Extension*. Neben Banden geringer Intensität (gestrichelte Pfeile) existieren vier Banden starker Intensität (durchgezogene Pfeile), die die Haupttranskriptionsstartstellen darstellen. Als Größenstandard wurde das Reaktionsprodukt einer Sequenzierungsreaktion mit dem Plasmid pUC19-*EcoRI*(PXR), welches einen Sequenzbereich des PXR Gens von jeweils ungefähr 3 kb stromaufwärts und stromabwärts vom Transkriptionsstart enthält, als Matrize, und mit dem gleichen Primer wie bei der *Primer Extension* Reaktion mitgeführt.

3.3.1.2 RNA Ligase-mediated Rapid Amplification of 5' cDNA ends-PCR

Um das Ergebnis des *primer extension* Experiments zu überprüfen und um eine mögliche Gewebespezifität der Transkriptionsinitiation in Leber und Darm zu untersuchen, wurde die Transkriptionsstartstelle des PXR Gens mittels RLM-RACE-PCR mit Gesamt-RNA aus humanem Leber- und Duodenalgewebe jeweils eines Patienten mit hoher PXR mRNA Expression aus der Studie IKP113 (Leber: Patient L; Darm: Patient S) und mit polyA⁺ RNA aus der Colonadenocarcinomzelllinie LS174T bestimmt.

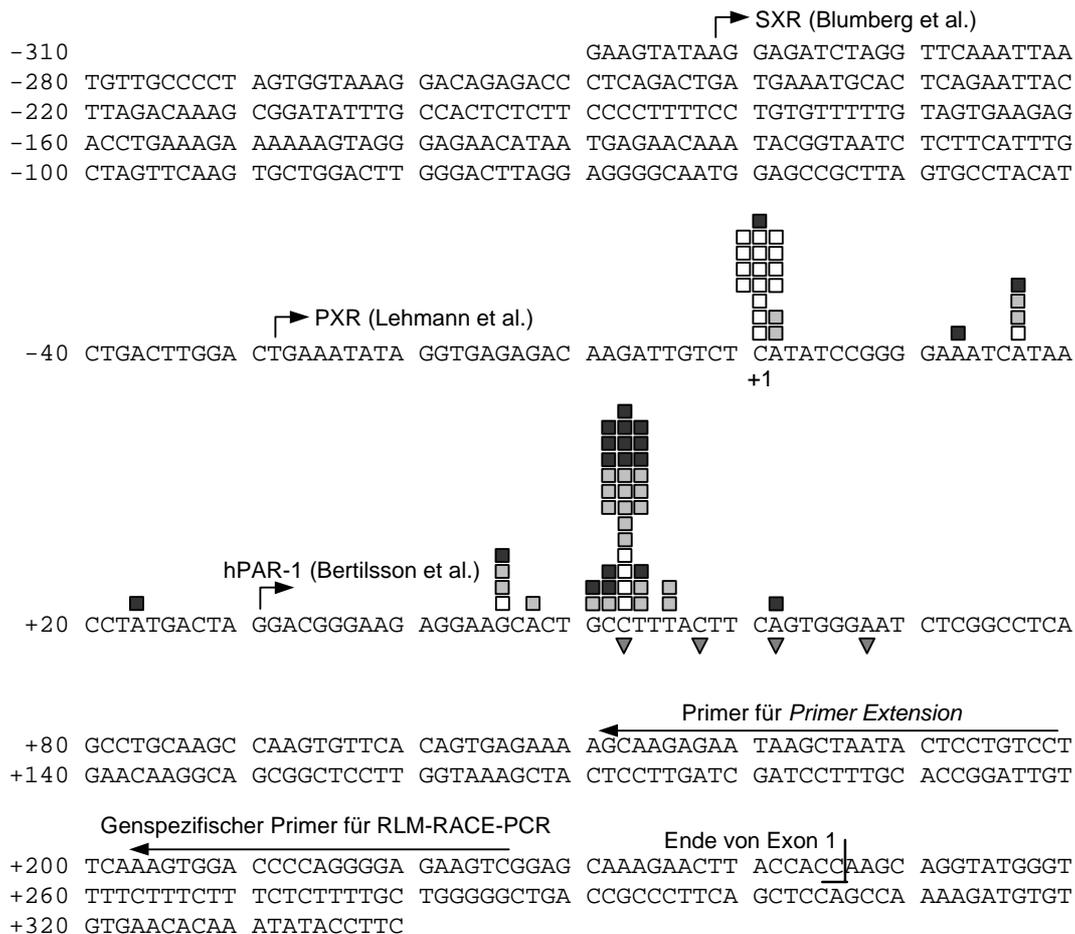


Abbildung 13. Identifikation der Transkriptionsstartstelle des PXR Gens in menschlicher Leber, im Darm und in LS174T Zellen mittels *Primer Extension* und *RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction*.

Die vier mittels *Primer Extension* identifizierte Hauptstartstellen sind als graue Dreiecke, die mittels RLM-RACE-PCR aus Gesamt-RNA aus Leber erhaltenen Klone als weiße Quadrate, aus Gesamt-RNA aus Darm erhaltene Klone als hellgraue Quadrate und aus polyA⁺ RNA aus LS174T Zellen erhaltene Klone als dunkelgraue Quadrate dargestellt. Die von Blumberg et al., Lehmann et al. und Bertilsson et al. angegebenen 5' Termini sind als abknickende Pfeile dargestellt. Der Transkriptbeginn der Mehrheit (15/21) der analysierten Klone aus Gesamt-RNA aus Leber liegt 29 bp stromabwärts von der von Lehmann et al. angegebenen Startstelle, der der Mehrheiten der analysierten Klone aus Gesamt-RNA aus Darm (10/23) und aus polyA⁺ RNA aus LS174T Zellen (10/20) liegt 52 bp stromabwärts vom mit (+1) bezeichneten Haupttranskriptionsstart in Leber.

Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, befand sich bei der großen Mehrheit (15 von 21 Klone) der klonierten cDNAs aus menschlicher Leber das 5' Ende der mRNA an einer Position die 29 bp stromabwärts des von Lehmann et al. angegebenen cDNA-Endes liegt. Bei 4 der 21 Klone befand sich der 5' Terminus 81 bp stromabwärts von dieser Position, bei den beiden restlichen Klone lag das 5' Ende im Bereich zwischen diesen beiden Hauptinitiationsstellen.

Bei der Analyse von Gesamt-RNA aus Duodenalgewebe waren die 5' Termini der klonierten cDNAs etwas breiter gestreut. Bei 10 von 23 analysierten Klone war der 5' Terminus am gleichen Nucleotid lokalisiert an dem auch die 4 der 21 Klone aus Gesamt-RNA aus Leber lagen, die 5' Enden 9 weiterer Klone lagen in einem schmalen Bereich von 7 bp stromaufwärts bis 3 bp stromabwärts von dieser Position. Die cDNA 5' Termini zweier Klone befanden sich 1 bp stromabwärts von der Position, bei der die Mehrheit der Klone aus Gesamt-RNA aus Leber lag, die 5' Enden der zwei restlichen Klone waren 15 bp stromabwärts von dieser Position lokalisiert (Abbildung 13).

Die RLM-RACE-PCR mit polyA⁺ RNA aus LS174T Zellen ergab eine sehr ähnliche Verteilung der 5' Termini wie mit RNA aus Duodenalgewebe. Bei 10 von 20 Klone befand sich das 5' Ende an der Hauptinitiationsstelle der Transkripte aus Gesamt-RNA aus Duodenum, 4 von 20 Klone lagen im Bereich von 2 bp stromaufwärts bis 1 bp stromabwärts von dieser Position. Ein Klon befand sich 10 bp stromabwärts, ein weiterer Klon 7 bp stromaufwärts. Ein Klon war an der Hauptinitiationsstelle in der Leber lokalisiert, die drei übrigen Klone lagen zwischen dieser Position und der Hauptinitiationsstelle im Darm (Abbildung 13).

Insgesamt deuten die Daten darauf hin, dass eine gewisse Gewebespezifität der Transkriptionsinitiation besteht, da die mRNA Transkripte aus Leber mehrheitlich 52 bp stromaufwärts von der Haupttranskriptionsstartstelle im Darm beginnen. Diese Spezifität ist allerdings nicht vollkommen stringent, da sowohl im Darm Transkripte vorkommen, deren Beginn identisch ist mit dem der vorherrschenden mRNA Transkripte in der Leber, als auch vice versa. Weiterhin treten vereinzelt Transkripte auf, die in unmittelbarer Nachbarschaft der Hauptinitiationsstellen in Leber und Darm sowie im Bereich zwischen diesen beiden Positionen beginnen.

Für die Nomenklatur der Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte ist im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Nucleotidposition mit +1 bezeichnet, an der die Transkription der Mehrheit der RNA Transkripte aus Leber beginnt.

3.3.2 Subklonierung der 5' flankierenden Region des PXR Gens

Nachdem die Positionen an denen die Transkriptionsinitiation des PXR Gens in der Leber und im Darm des Menschen stattfindet, ermittelt worden waren, wurde ein Teil der stromaufwärts vom Transkriptionsstart liegenden 5' flankierenden Region des PXR Gens vor das Reporter-gen Luciferase+ in den Vektor pGL3-Basic subkloniert. Als Ausgangsmaterial wurde ein freundlicherweise von Frau Dr. Elisabeth Hustert zur Verfügung gestelltes Plasmid verwendet, in das ein *EcoRI*-Fragment eines BAC-Klons (GenomeSystems GS21908) subkloniert worden war, der das menschliche PXR Gen enthält (Hustert et al., 2001b). Das im Plasmid enthaltene *EcoRI* Fragment entsprach der genomischen Sequenz zwischen Position 2203146 und 2208578 der in der *GeneBank* Datenbank notierten Sequenz des PXR Gens (*GeneBank accession #* NT005994). Details zur Subklonierung des Fragments in den Vektor pGL3-Basic sind in Abbildung 14 gezeigt und in Abschnitt 2.2.7 beschrieben.

Das hergestellte parentale Promotor-Reporter-gen-Konstrukt pGL3-PXR(-2543) enthält den Bereich von -2543 bis +195 des PXR Gens relativ zur in dieser Arbeit bestimmten Transkriptionsstartstelle in Leber. Das subklonierte Fragment enthält die bekannten Nucleotidvarianten/SNPs 2203592C>T (dbSNP #4688038; Position -2088 in pGL3-PXR(-2543)), 2204392A>G (dbSNP #1523129; Position -1288 in pGL3-PXR(-2543)), 2204819C>T (dbSNP #3814055, Position -861 in pGL3-PXR(-2543)), 2205448A>G (dbSNP #1523128, Position -232 in pGL3-PXR(-2543)) und die Variante 2203799A>G (dbSNP #4687883, Position -1881 in pGL3-PXR(-2543)) an deren Position bisher nur die A>T und A>C Varianten in der Sequenzdatenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) aufgeführt sind. Weiterhin ist ein aus 12 Adenosylresten bestehender Oligo(A)-Bereich zwischen Position 2203456 und 2203467 (ab Position -2213 in pGL3-PXR(-2543)) im subklonierten Fragment um 9 Adenosylreste auf 21 Reste verlängert.

3.3.3 Generierung einer Bibliothek von Promotor-Reporter-gen-Konstrukten mit unidirektional verkürzten Promotorfragmenten des PXR Gens

Ausgehend vom parentalen Promotor-Reporter-gen-Konstrukt pGL3-PXR(-2543) wurde das subklonierte PXR Promotorfragment mittels Verdau mit geeigneten Restriktionsendonucleasen und anschließender Religation bzw. durch Verdau mit *KpnI/EcoRI*, Exonuclease III, *Mung Bean* Nuclease und nachfolgender Religation vom 5' Terminus her verkürzt und eine Bibliothek unidirektional verkürzter Promotorfragmente des PXR Gens hergestellt (Abbildung 15). Nähere Details zur Generierung der Bibliothek sind im Abschnitt 2.2.7 beschrieben.

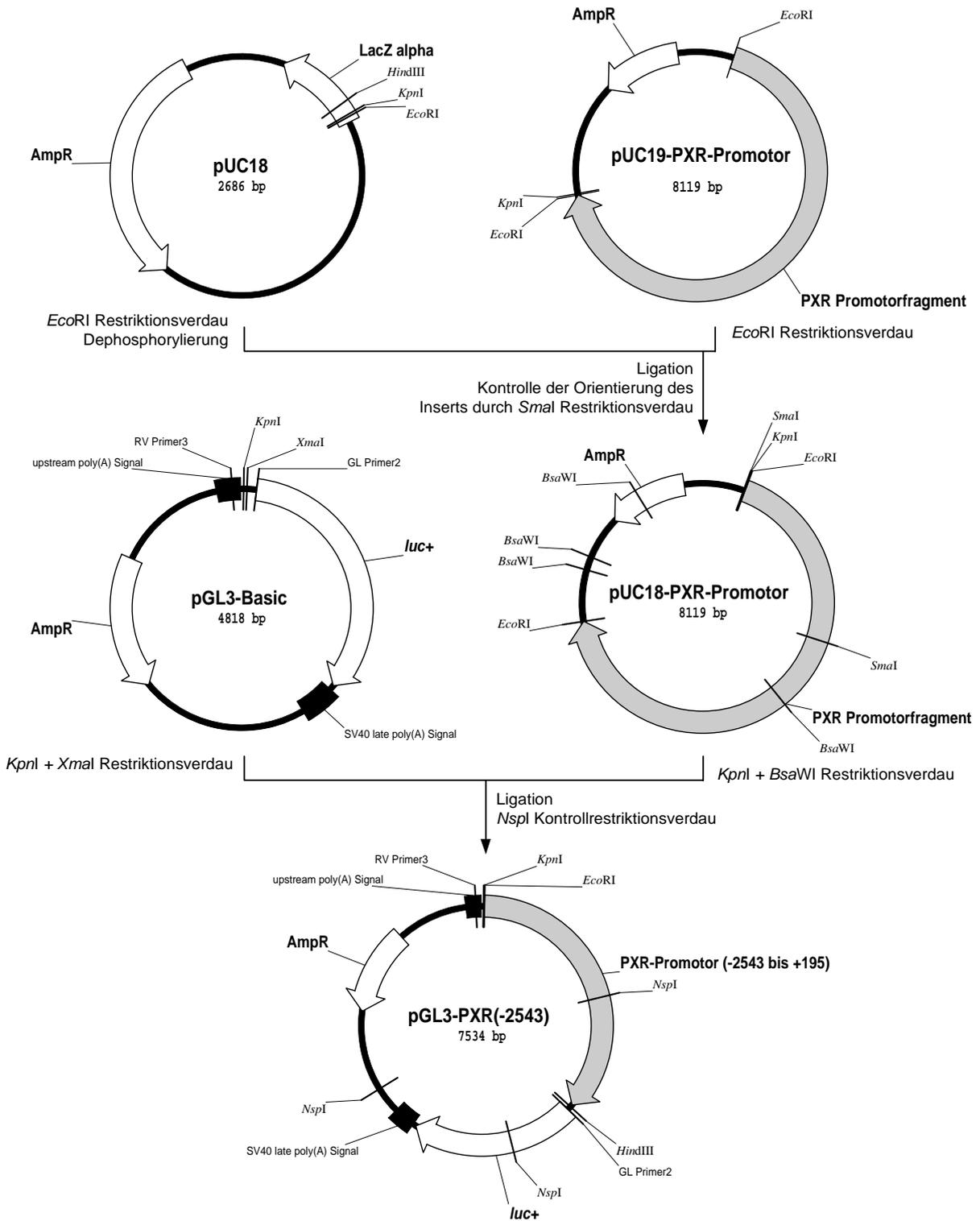


Abbildung 14. Subklonierung der 5' flankierenden Region des PXR Gens von -2543 bis +195.

Der Ausgangsvektor, der das PXR-Promotorfragment enthielt, war zunächst nicht bekannt. Das Promotorfragment wurde durch Verdau mit *EcoRI* ausgeschnitten, gelelektrophoretisch isoliert und in den ebenfalls mit *EcoRI* verdauten und anschließend mittels Shrimp Alkalischer Phosphatase dephosphorylierten Vektor pUC18 subkloniert. Die korrekte Orientierung des Fragmentes wurde durch Restriktionsverdau mit *SmaI* überprüft. Anschließend wurde der Bereich von -2543 bis +195 des PXR Promotors durch Verdau mit *KpnI* und *BsaWI* ausgeschnitten, durch Gelelektrophorese isoliert und in den mit *KpnI* und *XmaI* verdauten pGL3-Basic Vektor subkloniert. Die Identität des pGL3-PXR(-2543) Konstrukts wurde durch Restriktionsverdau mit *NspI* kontrolliert.

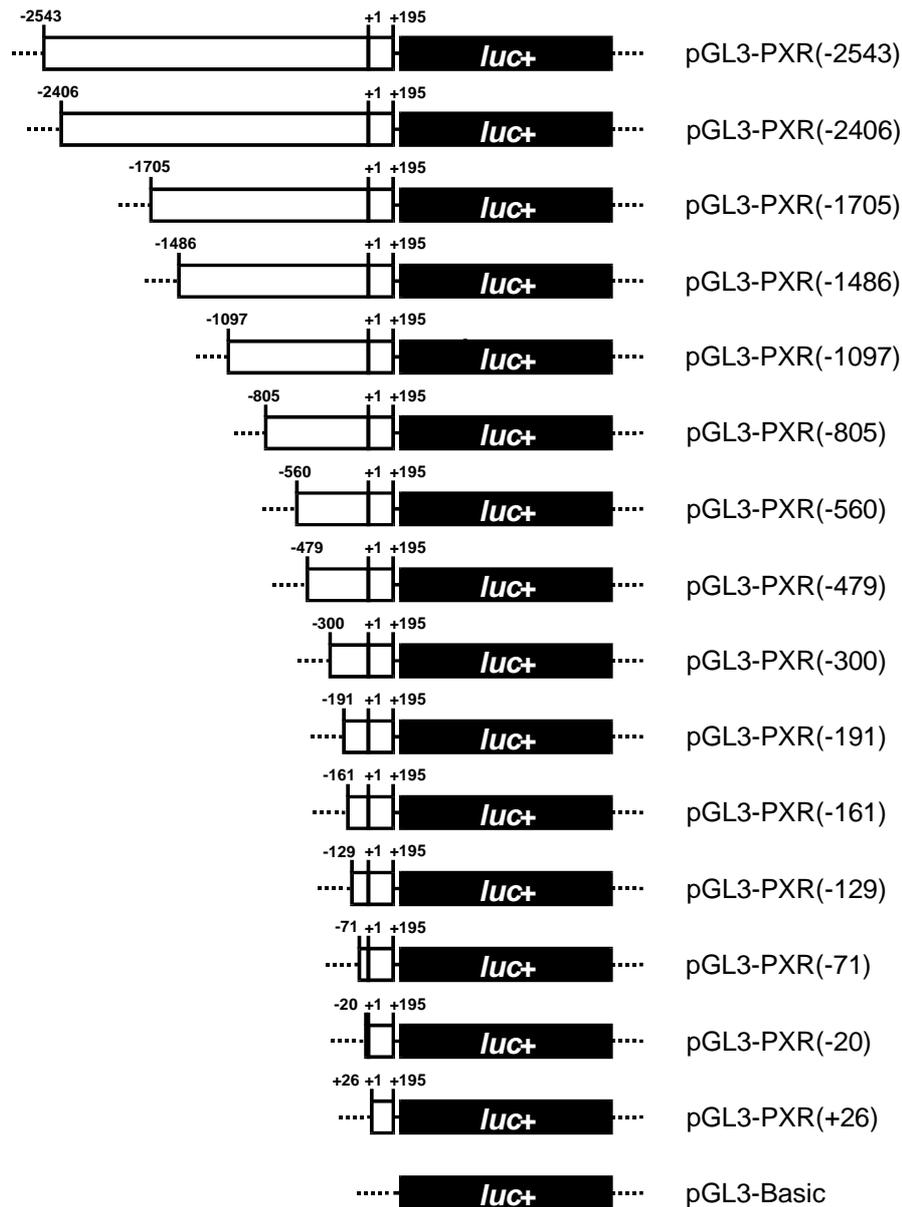


Abbildung 15. Bibliothek von Promotor-Reportergen-Konstrukten mit unidirektional verkürzten Promotorfragmenten des PXR Gens. Ausgehend vom parentalen Promotor-Reportergen-Konstrukt pGL3-PXR(-2543), welches den Bereich von -2543 bis +195 des PXR Gens relativ zur Haupttranskriptionsstartstelle in Leber enthält, wurde das subklonierte PXR Promotorfragment mittels Restriktionsverdau und anschließender Religation des verkürzten Plasmids bzw. durch Verdau mit *KpnI/EcoRI*, Exonuclease III, *Mung Bean* Nuclease und nachfolgender Religation vom 5' Terminus her verkürzt.

3.3.4 Basale Aktivität der PXR-Promotor-Reportergen-Konstrukte

Transfiziert man Zellen mit Promotor-Reportergen-Konstrukten kann durch die Bestimmung der Aktivität des von den transfizierten Zellen synthetisierten Proteinprodukts des Reportergens die transkriptionelle Aktivität eines klonierten Promotorbereichs im gewählten Zellsystem untersucht werden. Die Aktivität resultiert aus dem Zusammenspiel des untersuchten Promotorfragments und den

vorhandenen oder abwesenden Transkriptionsfaktoren, Kernrezeptoren und akzessorischen Faktoren, die an der Regulation der Transkription beteiligt sind, sowie deren Interaktionen und Mengenverhältnisse zueinander. Durch den Vergleich der Aktivitäten von modifizierten, d.h. verkürzten oder mit Mutationen versehenen Promotorfragmenten können Sequenzbereiche und Elemente des Promotors identifiziert werden, welche an der Regulation der Transkription beteiligt sind bzw. für die Promotoraktivität notwendig, hinreichend oder verantwortlich sind. Wird die Transfektion ohne Co-Transfektion von Expressionsplasmiden für Proteine durchgeführt, die einen Einfluss auf das Transkriptionsgeschehen haben können, so ergibt sich die Promotoraktivität allein aus der Interaktion mit den endogen im gewählten System zelltypspezifisch vorhandenen Faktoren. So können gewebespezifische Unterschiede in der Regulation untersucht werden und gegebenenfalls Rückschlüsse auf das basale Transkriptionsgeschehen in zum Zellkultursystem ähnlichen oder verwandten Geweben gezogen werden.

Um gewebespezifische Effekte der Regulation der PXR Expression zu untersuchen, wurden die humane Colonadenocarcinomzelllinie LS174T und die humane Hepatomzelllinie HepG2 als Modelle für die Regulation in Darm- und Lebergewebe verwendet. In beiden Zelllinien wird der Pregnan-X-Rezeptor exprimiert, in den LS174T Zellen stark, in den HepG2 Zellen in geringerem Ausmaß (persönliche Mitteilung O.Burk). Zum Vergleich wurden die humane Cervixcarcinomzelllinie HeLa sowie die Affennierenepithelzelllinie COS-1 als Zellkulturmodelle in denen kein endogenes PXR vorhanden ist, und die daher zur Untersuchung des Einflusses von co-transfizierten, exogenen Transkriptionsfaktoren geeignet sind, verwendet.

3.3.4.1 Basale Aktivität der Reporterengenkonstrukte in LS174T Zellen

Die stärkste basale Aktivität der Reporterengenkonstrukte konnte in den LS174T Zellen beobachtet werden (Abbildung 16). Das parentale Konstrukt pGL3-PXR(-2543) zeigte eine mehr als 1000-fach höhere Aktivität als der leere Reporterengenvektor pGL3-Basic. Die Aktivität der Konstrukte pGL3-PXR(-2543) bis pGL3-PXR(-129) zeigte keine besonders starken Schwankungen, wobei ein lokales Aktivitätsminimum bei pGL3-PXR(-1097) vorliegt. Die Standardabweichungen der aus drei unabhängigen Experimenten ermittelten Mittelwerte sind vergleichsweise groß. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Promotoraktivitäten auf die Aktivität von pGL3-Basic normalisiert wurden, welche absolut zwar nur in geringem Ausmaß, relativ zu den Aktivitäten der Promotorkonstrukte gesehen jedoch erheblich schwankte. Besonders auffallend ist der dramatische Abfall der Promotoraktivität zwischen den Konstrukten pGL3-PXR(-129) und pGL3-PXR(-71). Die Aktivität des Konstrukts pGL3-PXR(-20) ist wieder etwas höher, wohingegen die Aktivität von pGL3-PXR(+26) beinahe auf dem Niveau von pGL3-Basic ist.

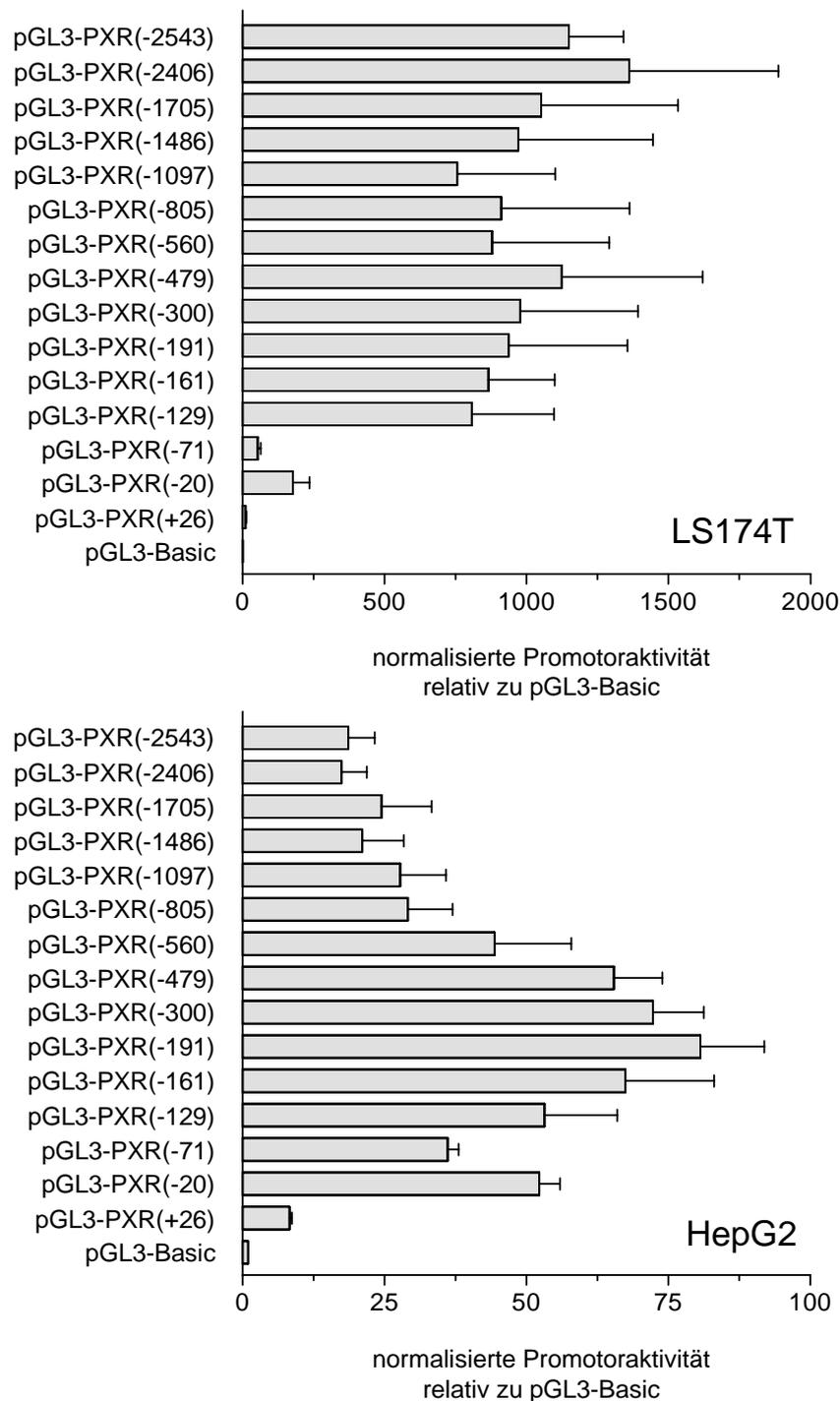


Abbildung 16. Transiente Transfektion der Plasmidbibliothek unidirektionaler PXR-Promotorverkürzungen in LS174T (oben) und HepG2 Zellen (unten). Die Zellen wurden mit 150 ng Reportergenkonstrukt, 20 ng pCMV β Vektor und 30 ng pcDNA3 (leerer Expressionsvektor) transfiziert. Die Zellen wurden 7 h mit den DNA Komplexen inkubiert, nach 48 h lysiert und die Luciferase- und β -Galactosidase-Aktivitäten der Extrakte bestimmt. Die Balken stellen den auf die normalisierte Aktivität von pGL3-Basic bezogenen Mittelwert der auf die β -Galactosidaseaktivität normalisierten Luciferaseaktivität dreier unabhängiger Experimente dar, die jeweils als Triplikate durchgeführt wurden. Auffallend ist der beträchtliche Verlust an Promotoraktivität zwischen pGL3-PXR(-129) bzw. pGL3-PXR(-191) und pGL3-PXR(-71), die erneute Aktivitätszunahme bei pGL3-PXR(-20) und der starke Verlust bei pGL3-PXR(+26) in beiden Zelllinien. Bemerkenswert ist auch die stetige Zunahme der Promotoraktivität von pGL3-PXR(-2543) bis pGL3-PXR(-191) in HepG2 Zellen.

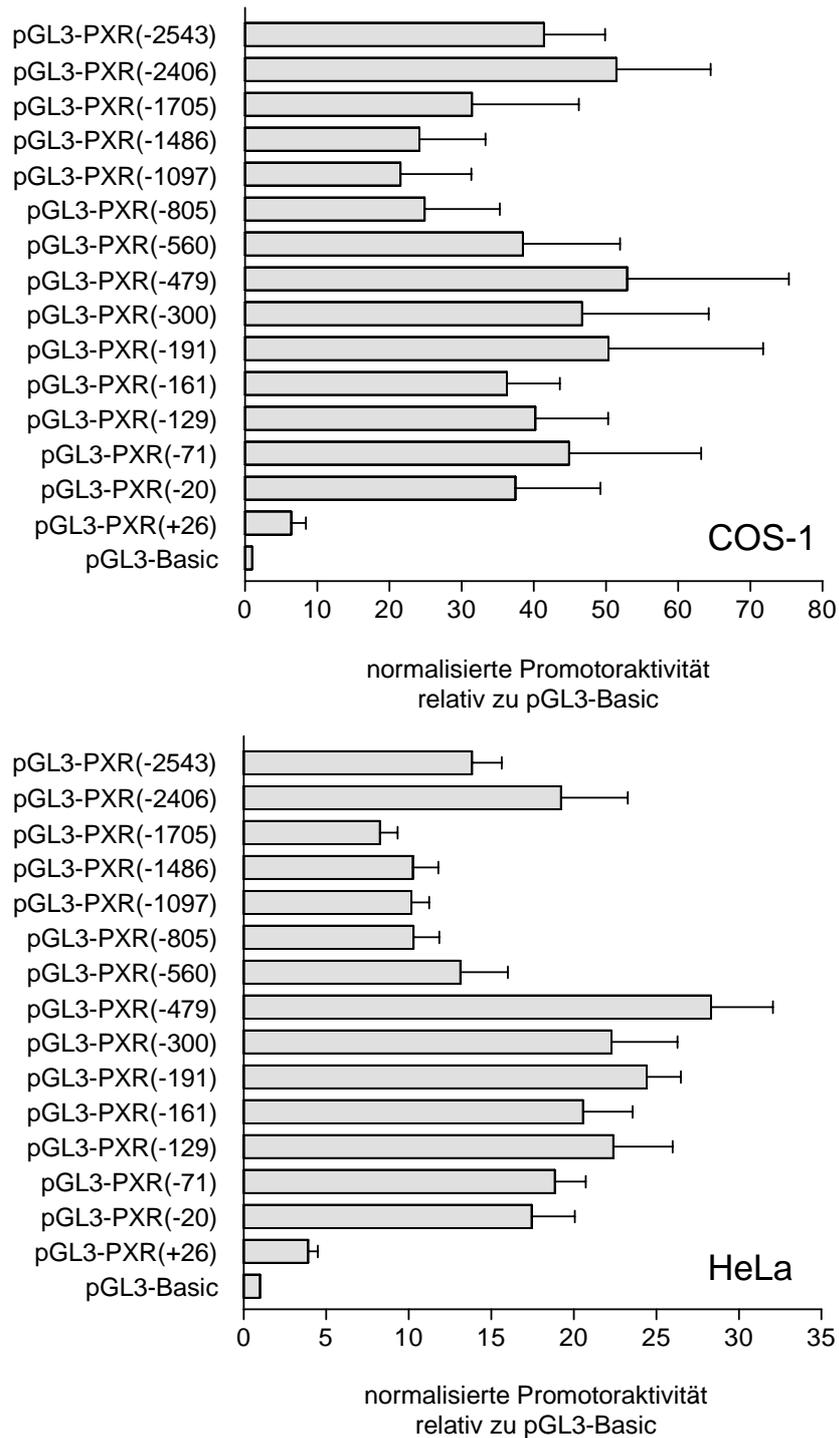


Abbildung 17. Transiente Transfektion der Plasmidbibliothek unidirektionaler PXR-Promotorverkürzungen in COS-1 (oben) und HeLa Zellen (unten). Die Zellen wurden mit 150 ng Reportergenkonstrukt, 20 ng pCMV β Vektor und 30 ng pcDNA3 (leerer Expressionsvektor) transfiziert. Die Zellen wurden 5 h mit den DNA Komplexen inkubiert, nach 48 h lysiert und die Luciferase- und β -Galactosidase-Aktivitäten der Extrakte bestimmt. Die Balken stellen den auf die normalisierte Aktivität von pGL3-Basic bezogenen Mittelwert der auf die β -Galactosidaseaktivität normalisierten Luciferaseaktivität dreier unabhängiger Experimente dar, die jeweils als Triplikate durchgeführt wurden. Auffallend ist der drastische Verlust der Promotoraktivität zwischen pGL3-PXR(-20) und pGL3-PXR(+26), sowie die relative geringen Aktivitäten der Konstrukte pGL3-PXR(-1705) bis pGL3-PXR(-560).

3.3.4.2 Basale Aktivität der Reporterengenkonstrukte in HepG2 Zellen

Die basale Aktivität der Reporterengenkonstrukte in HepG2 Zellen nahm von knapp 20-fach bei pGL3-PXR(-2543) bis knapp 80-fach bei pGL3-PXR(-191) verglichen mit pGL3-Basic (Abbildung 16) beinahe stetig zu, wobei die Zunahme der Aktivität hauptsächlich zwischen pGL3-PXR(-805) und pGL3-PXR(-191) stattfand. Von pGL3-PXR(-191) bis pGL3-PXR(-71) nimmt die Promotoraktivität wie in den LS174T Zellen ab, jedoch nicht so drastisch wie dort und nimmt ebenfalls beim Konstrukt pGL3-PXR(-20) wieder zu. Beim Konstrukt pGL3-PXR(+26) fällt die Aktivität ebenfalls stark ab, jedoch ist die Aktivität dieses Konstrukts in den HepG2 Zellen immer noch beinahe halb so hoch wie die des parentalen Konstrukts pGL3-PXR(-2543) und damit relativ hoch verglichen mit den anderen untersuchten Zelllinien.

3.3.4.3 Basale Aktivität der Reporterengenkonstrukte in COS-1 Zellen

In COS-1 Zellen zeigte das parentale Reporterengenkonstrukt pGL3-PXR(-2543) eine ungefähr 40-fach stärkere Aktivität als der Leervektor pGL3-Basic (Abbildung 17). Betrachtet man die gesamte Serie der Promotorverkürzungen, so ergibt sich ein charakteristisches Profil der Promotoraktivitäten, die basale Aktivität nimmt von pGL3-PXR(-2406) bis pGL3-PXR(-1097) ab. Anschließend nimmt die Promotoraktivität von pGL3-PXR(-1097) bis pGL3-PXR(-479) wieder zu, bleibt bis zum Konstrukt pGL3-PXR(-20) relativ konstant und fällt beim Übergang zwischen pGL3-PXR(-20) und pGL3-PXR(+26) sehr stark ab.

3.3.4.4 Basale Aktivität der Reporterengenkonstrukte in HeLa Zellen

In der Cervixcarcinomzelllinie HeLa ist die Promotoraktivität des Konstrukts pGL3-PXR(-2543) ungefähr 14-fach stärker als die von pGL3-Basic und es ergibt sich ein Profil der Promotoraktivitäten, welches mit dem in COS-1 Zellen vergleichbar ist (Abbildung 17). Die Konstrukte pGL3-PXR(-1705), pGL3-PXR(-1486), pGL3-PXR(-1097), pGL3-PXR(-805) und pGL3-PXR(-560) weisen eine vergleichsweise niedrige Aktivität auf, während das Konstrukt pGL3-PXR(-479) maximale Aktivität zeigt. In den nachfolgenden Konstrukten mit weiter verkürztem PXR Promotor bis pGL3-PXR(-20) nimmt die Aktivität relativ gleichmäßig langsam ab und fällt wie in den COS-1 Zellen beim Konstrukt pGL3-PXR(+26) drastisch ab.

Insgesamt betrachtet zeigten die PXR-Promotor-Reporterengen-Konstrukte in allen verwendeten Zelllinien eine stärkere oder viel stärkere Aktivität als der leere Reporterengenvektor pGL3-Basic.

Es fällt auf, dass sich die Aktivitätsprofile der Reporterengenkonstruktserie in den Zelllinien mit Expression von endogenem PXR (LS174T und HepG2) gleichen und dass sich die Aktivitätsprofile der Zelllinien, die kein endogenes PXR exprimieren (COS-1 und HeLa) einander gleichen. Weiterhin fällt auf, dass die Promotoraktivität in der LS174T Zelllinie, welche eine besonders starke Expression

von endogenem PXR aufweist, im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien besonders hoch war.

Ein hervorstechendes Merkmal ist ein weitgehender Verlust der Promotoraktivität beim Übergang vom Konstrukt pGL3-PXR(-129) zu pGL3-PXR(-71) in den LS174T bzw. ein erheblicher Verlust zwischen pGL3-PXR(-191) und pGL3-PXR(-71) in den HepG2 Zellen. Dies spricht für ein in beiden Zelllinien transkriptionell relevantes regulatorisches Element in diesem Bereich. Der sich anschließende Wiederanstieg der Aktivität bei pGL3-PXR(-20) deutet auf ein inhibitorisch wirksames *cis-acting* Element zwischen Position -71 und -20 hin. Der weitgehende Aktivitätsverlust beim Konstrukt pGL3-PXR(+26) bestätigt den experimentell identifizierten Transkriptionsstartpunkt. In den HepG2 Zellen fällt zudem die stetige Zunahme der Promotoraktivität vom parentalen Konstrukt pGL3-PXR(-2543) bis pGL3-PXR(-191) auf, was wiederum auf ein oder mehrere potentiell vorhandene *cis-acting* Elemente mit der Fähigkeit zur Bindung inhibitorisch wirkender Faktoren zurückzuführen sein könnte.

Der in LS174T und HepG2 Zellen beobachtete beträchtliche Verlust der Aktivität zwischen pGL3-PXR(-191) und pGL3-PXR(-71) trat in COS-1 und HeLa Zellen nicht auf. Hervorzuheben ist in diesen Zelllinien eine verringerte Promotoraktivität bei den Konstrukten pGL3-PXR(-1705) bis pGL3-PXR(-560). Möglicherweise sind *cis-acting* Elemente, die mit in diesen Zelllinien spezifisch vorhandenen inhibitorisch wirkenden Faktoren interagieren, in diesem Bereich und vor allem zwischen -560 und -479 (vgl. Sprung der Promotoraktivität in HeLa Zellen), die Ursache. Außerdem trat auch hier der weitgehende Verlust der Promotoraktivität beim Konstrukt pGL3-PXR(+26) auf, bei dem der vor dem Reporter gen gelegene Bereich aus dem PXR Gen nur noch aus dem Sequenzbereich von +26 bis +195 relativ zum Transkriptionsstart in Leber besteht.

3.3.5 Aktivität der PXR-Promotor-Reportergen-Konstrukte bei Co-Transfektion von HNF4 α 1

Bei gleichzeitiger Co-Transfektion eines Expressionsplasmids für einen Transkriptionsfaktor, Kernrezeptor oder ein anderes Proteins, welches mutmaßlich an der Regulation der Transkription des Gens des untersuchten Promotors beteiligt ist, kann durch das Verhältnis der Promotoraktivitäten bei der Transfektion ohne den Transkriptionsfaktor bzw. nur mit dem leeren Expressionsvektor und der Aktivitäten bei gleichzeitiger Co-Transfektion des Expressionsplasmids eine qualitative Aussage über die Beteiligung des co-transfizierten Proteins, eine quantitative Aussage über das Ausmaß der Promotoraktivierung oder -reprimierung und gegebenenfalls auch über die Lokalisierung der für die Interaktion zwischen dem Promotor und dem co-transfizierten Faktor verantwortlichen Sequenzbereiche des Promotors getroffen werden.

Bisher waren noch keine an der Regulation der Transkription des menschlichen PXR Gens beteiligten Faktoren identifiziert. Da jedoch in den Lebern von HNF4 α ^{-/-} Mäuseföten das *Pxr* Gen nicht exprimiert wird (Li, J. et al., 2000), lag eine essentielle Beteiligung des *Hepatocyte Nuclear Factor 4 α* nahe. Um den Einfluss von HNF4 α auf die Aktivität des menschlichen PXR Promotors zu überprüfen und ein mögliche Gewebespezifität abzuklären, wurde die funktionelle Proteinisoform HNF4 α 1 mit der Plasmidbibliothek in LS174T, HepG2, COS-1 und HeLa Zellen co-transfiziert.

3.3.5.1 Aktivität der Reportergenkonstrukte bei Co-Transfektion von HNF4 α 1 in LS174T Zellen

In LS174T Zellen konnte die Promotoraktivität der Reportergenkonstrukte durch Co-Transfektion von HNF4 α 1 zwar gesteigert werden, das Ausmaß der Aktivierung ist jedoch bei allen Konstrukten durchgehend niedrig, zwischen 1,25 bei pGL3-Basic und knapp über 2 beim Konstrukt pGL3-PXR(-479) (Abbildung 18). Insgesamt läßt sich lediglich eine geringfügig höhere Aktivierbarkeit aller Reportergenkonstrukte im Vergleich zum leeren Reportergenvektor pGL3-Basic feststellen. Die geringe Aktivierbarkeit aller Konstrukte könnte auf die bereits ohne Co-Transfektion von HNF4 α 1 sehr starke basale Promotoraktivität der Reportergenkonstrukte bis zu pGL3-PXR(-129) von bis zu mehr als 1000-fach verglichen mit pGL3-Basic zurückzuführen sein (vgl. Abschnitt 3.3.4), so dass bereits eine nahezu maximale Promotoraktivität durch endogen exprimiertes HNF4 α (vgl. Abbildung 24) oder andere an der transkriptionellen Regulation beteiligte Faktoren vorliegen könnte.

3.3.5.2 Aktivität der Reportergenkonstrukte bei Co-Transfektion von HNF4 α 1 in HepG2 Zellen

Ein ähnliches Bild wie in den LS174T Zellen ergibt sich in HepG2 Zellen (Abbildung 18). Die Co-Transfektion von HNF4 α 1 bewirkt eine nahezu gleichstarken Anstieg der Promotoraktivität der meisten Reportergenkonstrukte um einen Faktor von ungefähr 1,2 bis 1,5. Allerdings geht diese schwache Aktivierbarkeit in HepG2 Zellen vom Konstrukt pGL3-PXR(-129) zum Konstrukt pGL3-PXR(-71) verloren, die kürzeren Konstrukte pGL3-PXR(-20) und pGL3-PXR(+26) sind ebenfalls nicht mehr durch HNF4 α 1 Co-Transfektion aktivierbar. Der leere Reportergenvektor pGL3-Basic erfährt sogar eine leicht Repression der Promotoraktivität um ungefähr 50%.

Analog zur auch in den LS174T Zellen beobachteten geringen Erhöhung der Promotoraktivität könnte auch hier eine bereits nahezu maximale Aktivität durch Interaktion mit HNF4 α und/oder anderen endogenen Faktoren (vgl. Abbildung 24) eine Ursache für die geringe Zunahme der Promotoraktivität durch Co-Transfektion von HNF4 α 1 darstellen, so dass eine Erhöhung der HNF4 α Menge keinen starken Effekt mehr hervorruft.

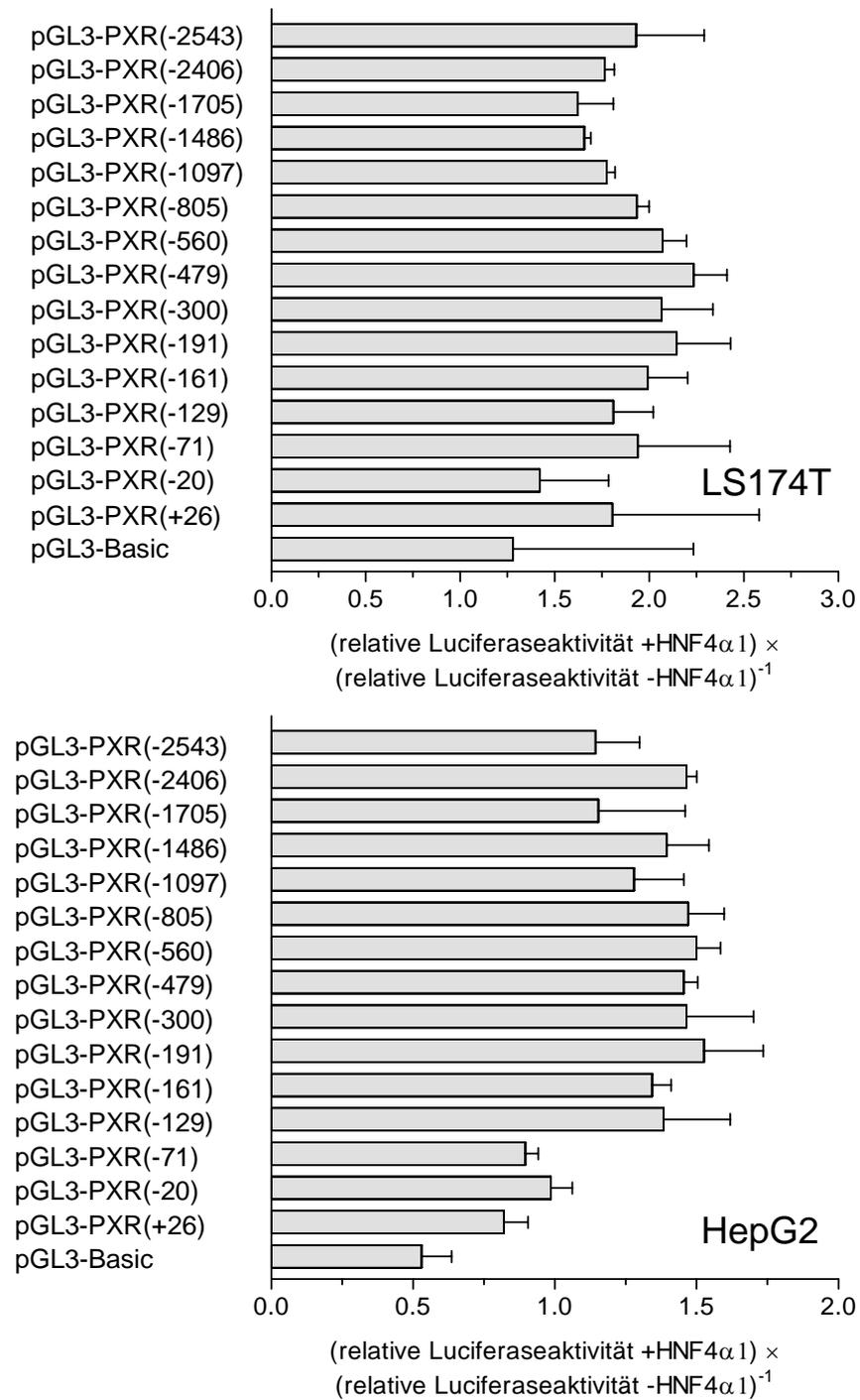


Abbildung 18. Co-Transfektion von LS174T und HepG2 Zellen mit der Plasmidbibliothek und HNF4 α 1 Expressionsplasmid. Die Zellen wurden mit 150 ng Reporterengenkonstrukt, 20 ng pCMV β Vektor und 30 ng Expressionsplasmid pcDhuHNF4 α 1 oder leerem pcDNA3 Vektor co-transfiziert. Die Balken stellen den durchschnittlichen Quotienten aus normalisierter Luciferaseaktivität relativ zu pGL3-Basic mit Co-Transfektion von pcDhuHNF4 α 1 und normalisierter Luciferaseaktivität relativ zu pGL3-Basic mit Co-Transfektion von pcDNA3 dreier unabhängiger Experimente dar, die jeweils als Triplikate durchgeführt wurden. Die Promotoraktivitäten waren in beiden Zelllinien nur geringfügig steigerbar, in den HepG2 Zellen geht die geringe Aktivierbarkeit zwischen dem Konstrukt pGL3-PXR(-129) und dem Konstrukt pGL3-PXR(-71) verloren.

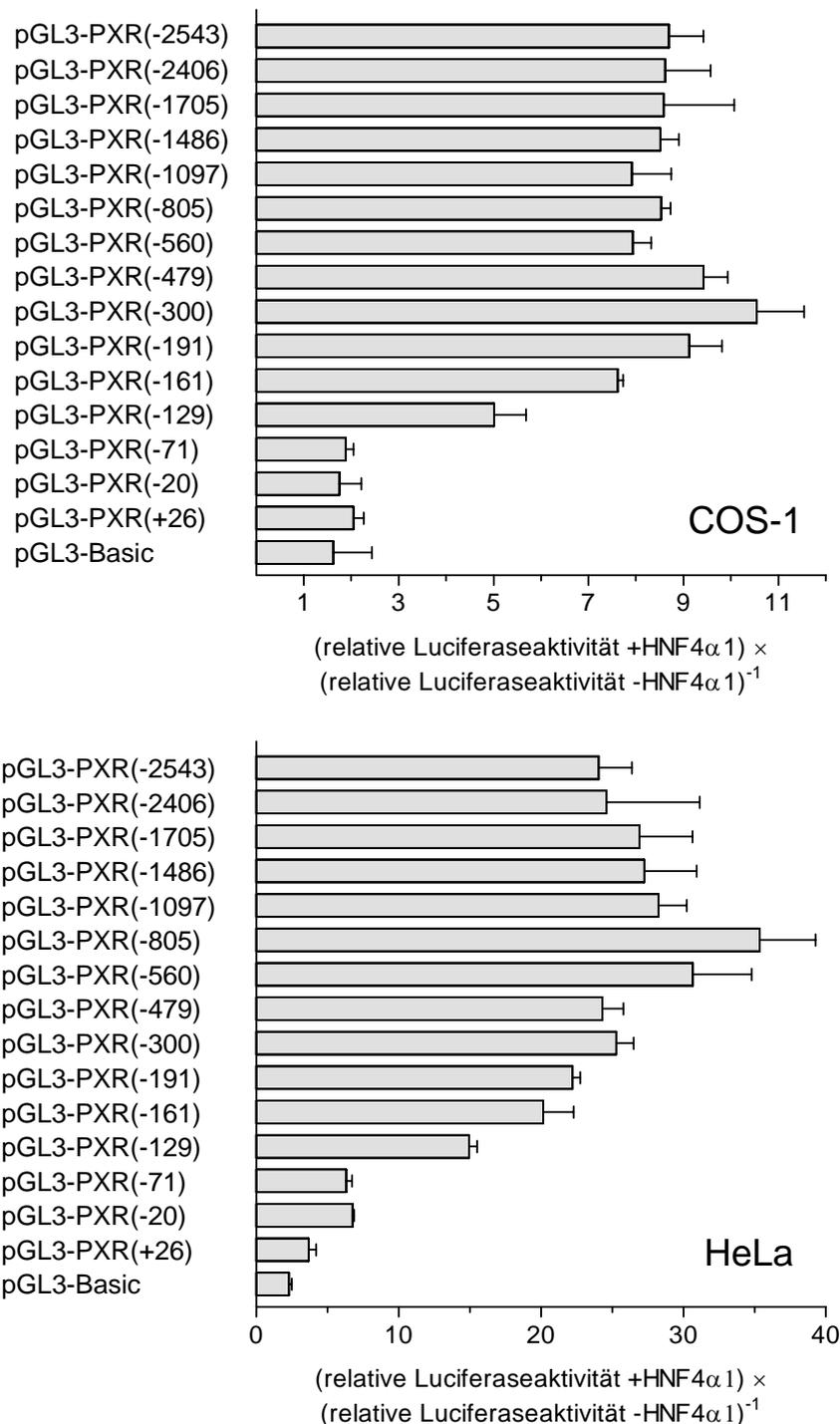


Abbildung 19. Co-Transfektion von COS-1 und HeLa Zellen mit der Plasmidbibliothek und HNF4 α 1 Expressionsplasmid. Die Zellen wurden mit 150 ng Reporter-genkonstrukt, 20 ng pCMV β Vektor und 30 ng Expressionsplasmid pcDhuHNF4 α 1 oder leerem pcDNA3 Vektor co-transfiziert. Die Balken stellen den durchschnittlichen Quotienten aus normalisierter Luciferaseaktivität relativ zu pGL3-Basic mit Co-Transfektion von pcDhuHNF4 α 1 und normalisierter Luciferaseaktivität relativ zu pGL3-Basic mit Co-Transfektion von pcDNA3 dreier unabhängiger Experimente dar, die jeweils als Triplikate durchgeführt wurden. Die Promotoraktivitäten wurden in beiden Zelllinien durch HNF4 α 1 Co-Transfektion stark erhöht, die Responsivität des Promotors beruht vor allem auf der Region zwischen -71 und -191.

3.3.5.3 Aktivität der Reporterengenkonstrukte bei Co-Transfektion von HNF4 α 1 in COS-1 Zellen

Im Gegensatz zu LS174T und HepG2 Zellen ist bei der Co-Transfektion von COS-1 Zellen, die kein endogenes HNF4 α exprimieren (vgl. Abbildung 24), mit HNF4 α 1 ein deutlicher Effekt zu erkennen. (Abbildung 19).

Der Quotient aus der relativen, normalisierten Luciferaseaktivität mit Co-Transfektion von HNF4 α 1 und der relativen, normalisierten Luciferaseaktivität ohne Co-Transfektion von HNF4 α 1 lag beim parentalen Konstrukt pGL3-PXR(-2543) zwischen 8 und 9 und die Aktivierbarkeit verbleibt bei den Deletionskonstrukten bis pGL3-PXR(-191) im Bereich zwischen 8 und 10, um dann stufenweise über pGL3-PXR(-161) und pGL3-PXR(-129) auf knapp unter 2-fach beim Konstrukt pGL3-PXR(-71) abzunehmen. Bei den weiteren Verkürzungen und bei pGL3-Basic verbleibt die Aktivierbarkeit in diesem Bereich von 1,5- bis 2-fach. Die Verstärkung der Promotoraktivität durch HNF4 α 1 scheint also in COS-1 Zellen durch ein oder mehrere responsive Elemente im Sequenzbereich zwischen -71 und -191 stromaufwärts vom Transkriptionsstart vermittelt zu werden. Da in COS-1 Zellen kein HNF4 α exprimiert wird, ist ein deutlicher Effekt der Co-Transfektion zu erkennen.

3.3.5.4 Aktivität der Reporterengenkonstrukte bei Co-Transfektion von HNF4 α 1 in HeLa Zellen

In den HeLa Zellen ergibt sich ein qualitativ sehr ähnliches Aktivierungsprofil wie in den COS-1 Zellen (Abbildung 19). Die Aktivität des längsten Promotorkonstrukts pGL3-PXR(-2543) kann durch Co-Transfektion von HNF4 α 1 um einen Faktor von ungefähr 23 erhöht werden, nach Zunahme der Aktivierbarkeit auf bis zu knapp 35-fach für pGL3-PXR(-805) verringert sie sich wieder bis auf ungefähr 20-fach bei pGL3-PXR(-191) und nimmt dann stufenweise, wie in den COS-1 Zellen, auf bis knapp 6-fach bei pGL3-PXR(-71) ab. Beim Konstrukt pGL3-PXR(+26) nimmt sie noch einmal auf knapp 4-fach ab, um bei pGL3-Basic auf 2,5-fach zu fallen. Obwohl die Abnahme der Aktivierbarkeit von Konstrukt pGL3-PXR(-805) bis zum Konstrukt pGL3-PXR(-71) durch das stetige Fallen eher kontinuierlich erscheint, findet in Übereinstimmung mit den Experimenten in COS-1 und HepG2 Zellen dennoch ein verhältnismäßig starker Verlust der Aktivierbarkeit zwischen pGL3-PXR(-129) bzw. pGL3-PXR(-191) und pGL3-PXR(-71) erkennbar.

In den HNF4 α exprimierenden Zelllinien LS174T und HepG2 läßt sich die Promotoraktivität durch Co-Transfektion von HNF4 α 1 also nur geringfügig steigern, während in COS-1 und HeLa Zellen, welche kein endogenes HNF4 α exprimieren, eine deutliche Zunahme der Promotoraktivität erzeugt werden konnte. Das oder die responsiven Elemente scheinen dabei im Sequenzbereich zwischen -191 und -71 stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt zu liegen, der gleichen Region, die für einen Großteil der basalen Promotoraktivität in LS174T und HepG2 Zellen verantwortlich ist.

3.3.6 Aktivität von PXR-Promotor-Reportergen-Konstrukten mit mutierten DR1 Motiven

Betrachtet man die Ergebnisse der transienten Transfektionsexperimente mit und ohne Co-Transfektion von HNF4 α 1 gemeinsam, so scheint eine Interaktion zwischen HNF4 α 1 und einem oder mehreren Elementen im Bereich der 5' flankierenden Region zwischen Position -129 und -71 wahrscheinlich. In LS174T und HepG2 Zellen, den Zellen, in denen endogenes HNF4 α exprimiert wird, liegt in diesem Bereich ein für die basale Promotoraktivität relevantes Element, und in den Co-Transfektionsexperimenten geht die Aktivierbarkeit des Promotors durch HNF4 α 1 Co-Transfektion analog dazu hauptsächlich im Sequenzbereich zwischen -191 bzw. -129 und -71 verloren. Dies ist besonders eindrücklich in den COS-1 Zellen zu sehen (vgl. Abschnitt 3.3.5).

Daher wurde in einer *in silico* Sequenzanalyse nach potentiellen HNF4 α *response elements* im Bereich zwischen -191 und -71 gesucht. HNF4 α bindet bevorzugt an Elemente vom DR1 Typ, als Suchmotive wurden daher das allgemeine Halbseitenmotiv für Kernrezeptorbindungsstellen als DR1 Element RGKTCA N RGKTCA sowie das HNF4 α -Konsensusbindungsmotiv RGDBYA R RGKBYN (Sladek, 1994) verwendet. Die Suche ergab zwei DR1 Motive mit guter Übereinstimmung zu den Suchmotiven, zum einen das in *sense* Orientierung liegende Motiv AGTTCA A GTGCTG an Position -98 bis -86, und das in *antisense* Orientierung vorliegende Motiv AGTCCC A AGTCCA an Position -75 bis -87 oberhalb des Transkriptionsstarts (Abbildung 20 unten).

Um die ursächliche Beteiligung eines oder beider Bindungsmotive an der Aktivierung des PXR-Promotors durch HNF4 α 1 zu untersuchen, wurde die Sequenz der beiden mutmaßlichen Bindungselemente durch ortsgerichtete Mutagenese verändert. Die Mutagenese wurde am Reportergenkonstrukt pGL3-PXR(-191) durchgeführt, da dessen Promotoraktivität in allen verwendeten Zelllinien durch Co-Transfektion mit HNF4 α 1 genauso stark wie oder stärker als das parentale Konstrukt pGL3-PXR(-2543) induzierbar war.

Die Mutagenese des vom Transkriptionsstart distal gelegenen Bindungsmotivs ergab das Konstrukt pGL3-PXR(-191/-96T>A;-95T>A), die des proximalen Bindungsmotivs das Konstrukt pGL3-PXR(-191/-84A>T;-83C>T;-77A>T;-76C>T). Die Sequenz der modifizierten Bindungselemente und ein Vergleich der nativen und mutierten Bindungselemente mit den Konsensusbindungsmotiven ist in Abbildung 20 oben dargestellt. Um die Auswirkungen der Mutationen der mutmaßlichen Bindungsmotive zu untersuchen, wurden LS174T, HepG2, COS-1 und HeLa Zellen mit den mutierten Reportergenkonstrukten mit und ohne Co-Transfektion des Expressionsplasmids pcDhuHNF4 α 1 transient transfiziert.

3.3.6.1 Basale Aktivität von Reportergenkonstrukten mit mutierten DR1 Motiven

In allen vier Zelllinien zeigte sich bei der Transfektion mit den Reportergenkonstrukten PXR(-191/-96T>A;-95T>A) und pGL3-PXR(-191/-84A>T;-83C>T;-77A>T;-76C>T), bei denen jeweils eines der beiden potentiellen HNF4 α *response elements* mutiert worden war, dass die basale Promotoraktivität des Konstrukts pGL3-PXR(-191/-96T>A;-95T>A) nahezu unverändert verglichen mit der des nicht mutierten Konstrukts pGL3-PXR(-191) war. Dagegen entsprach die basale Promotoraktivität des pGL3-PXR(-191/-84A>T;-83C>T;-77A>T;-76C>T) Konstrukts in allen Zelllinien ungefähr derjenigen des kürzeren Konstrukts pGL3-PXR(-71), d.h. in LS174T Zellen ist die Aktivität des pGL3-PXR(-191/-84A>T;-83C>T;-77A>T;-76C>T) Konstrukts massiv niedriger als die von pGL3-PXR(-191), in HepG2 Zellen beträgt sie ungefähr die Hälfte und in COS-1 und HeLa Zellen ist sie jeweils nur minimal erniedrigt (Abbildung 21).

Daraus lässt sich schliessen, dass das DR1 Motiv an Position -75 bis -87 das im Bereich von -71 bis -191 oberhalb des Transkriptionsstarts entscheidende Element für die basale Promotoraktivität in LS174T und HepG2 Zellen ist, während das DR1 Motiv bei -98 bis -86 keine Rolle zu spielen scheint.

3.3.6.2 Aktivität von Reportergenkonstrukten mit mutierten DR1 Motiven bei Co-Transfektion mit HNF4 α 1

Die bei der Co-Transfektion der Zellen mit den mutierten Reportergenkonstrukten und dem HNF4 α 1 Expressionsplasmid pcDhuHNF4 α 1 erhaltenen Ergebnisse legen eine identische Interpretation nahe (Abbildung 22). Das Konstrukt pGL3-PXR(-191/-96T>A;-95T>A) ist durch Co-Transfektion von HNF4 α 1 weiterhin aktivierbar und zwar in einem vergleichbaren Ausmaß wie das nicht mutierte Konstrukt pGL3-PXR(-191) im jeweiligen Zelltyp. Anders das Konstrukt pGL3-PXR(-191/-84A>T;-83C>T;-77A>T;-76C>T), hier fällt die Aktivierbarkeit des Promotors durch HNF4 α 1 auf einen Faktor ab, wie er beim kürzeren Konstrukt pGL3-PXR(-71) erreicht wird. In COS-1 Zellen wird die Promotoraktivität nur noch um den Faktor zwei statt ungefähr neun erhöht, in HeLa Zellen ungefähr 6-fach statt ungefähr 20-fach. In den LS174T und HepG2 Zellen ist der Effekt dieser Mutation naturgemäß weniger auffallend, da in diesen Zelllinien die Steigerung der Promotoraktivität durch HNF4 α 1 Co-Transfektion mit ungefähr 1,25-fach bis 2,25-fach ohnehin nur gering war. Dennoch ist auch hier beim Konstrukt pGL3-PXR(-191/-84A>T;-83C>T;-77A>T;-76C>T) die Aktivierbarkeit verringert und liegt auf dem Niveau des Konstrukts pGL3-PXR(-71).

Es lässt sich also schlußfolgern, dass das DR1 Motiv bei -75 bis -87 das Element im Sequenzbereich -71 bis -191 ist, welches für das Ansprechen des PXR Promotors auf das HNF4 α 1 Protein verantwortlich ist.

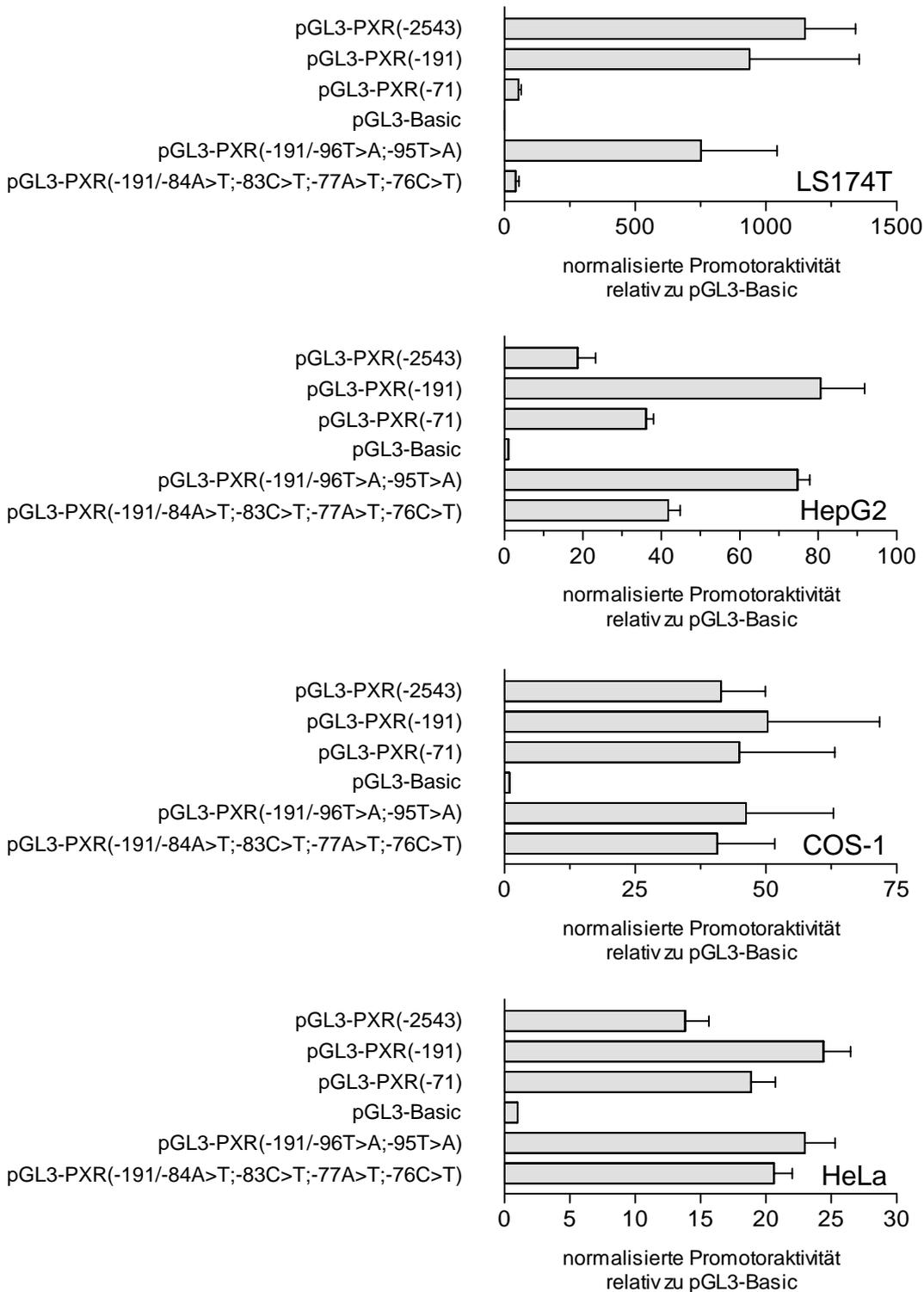


Abbildung 21. Transiente Transfektion von LS174T, HepG2, COS-1 und HeLa Zellen mit 150 ng Reporter-genkonstrukt, 20 ng pCMV β Vektor und 30 ng pcDNA3. Die basale Promotoraktivität des Konstrukts pGL3-PXR(-191/-96T>A;-95T>A) ist nahezu unverändert gegenüber der des nicht mutierten Konstrukts pGL3-PXR(-191). Dagegen zeigt das Konstrukt pGL3-PXR(-191/-84A>T;-83C>T;-77A>T;-76C>T) eine Promotoraktivität, die derjenigen des kürzeren Konstrukts pGL3-PXR(-71) entspricht, d.h. in LS174T und HepG2 Zellen ist die Aktivität von pGL3-PXR(-191/-84A>T;-83C>T;-77A>T;-76C>T) drastisch bzw. erheblich erniedrigt, in COS-1 und HeLa Zellen ist sie jeweils nur minimal erniedrigt.

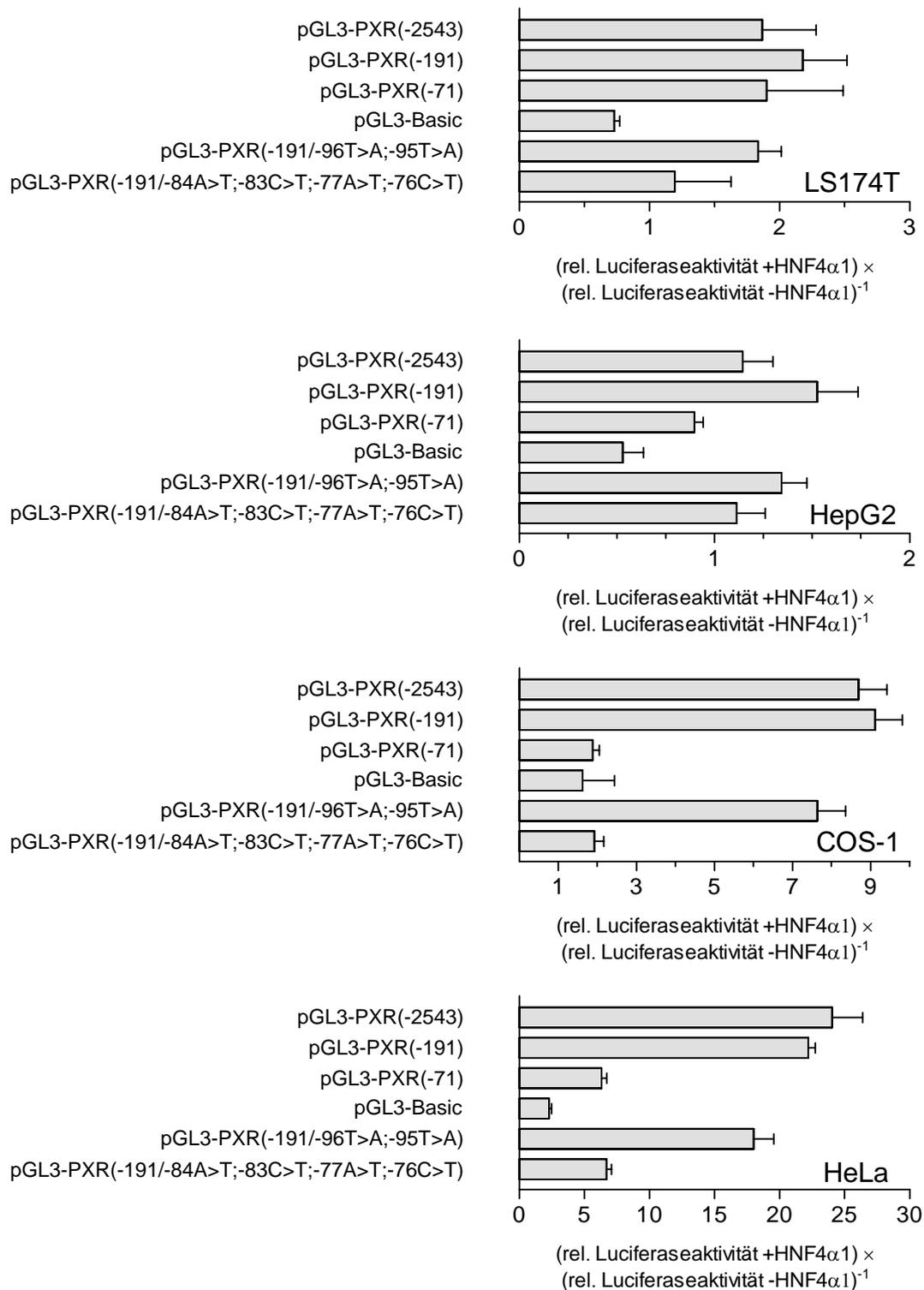


Abbildung 22. Co-Transfektion von LS174T, HepG2, COS-1 und HeLa Zellen mit 150 ng Reporter-genkonstrukt, 20 ng pCMV β Vektor und 30 ng Expressionsplasmid pcDhuHNF4 α 1 oder leerem pcDNA3 Vektor. Die Balken stellen den durchschnittlichen Quotienten aus normalisierter Luciferaseaktivität relativ zu pGL3-Basic mit Co-Transfektion von pcDhuHNF4 α 1 und normalisierter Luciferaseaktivität relativ zu pGL3-Basic mit Co-Transfektion von pcDNA3 dreier unabhängiger Experimente dar, die jeweils als Dreifachwerte durchgeführt wurden. Das Konstrukt pGL3-PXR(-191/-96T>A;-95T>A) ist durch Co-Transfektion von HNF4 α 1 weiterhin aktivierbar wie das nicht mutierte Konstrukt pGL3-PXR(-191) im jeweiligen Zelltyp. Bei pGL3-PXR(-191/-84A>T;-83C>T;-77A>T;-76C>T) ist die Aktivierbarkeit des Promotors durch HNF4 α 1 mit derjenigen von pGL3-PXR(-71) vergleichbar.

3.3.7 Interaktion von HNF4 α mit dem HNF4 α -RE im *Electrophoretic Mobility Shift Assay*

Eine Protein-DNA-Interaktion zwischen Transkriptionsfaktoren oder Kernrezeptoren und mutmaßlich zugehörigen *response elements* kann durch einen sogenannten *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) überprüft werden. Die zu testende DNA-Sequenz wird als kurzer Oligonucleotiddoppelstrang mit [³²P] radioaktiv markiert und nach Inkubation mit einer zu untersuchenden Proteinfraction, wie z.B. einem Kernextrakt oder *in vitro*-synthetisiertem Protein, einer Elektrophorese im Polyacrylamidgel unterzogen. Die Wanderungsgeschwindigkeit von Protein-DNA-Komplexen ist sehr viel geringer als die des ungebundenen, radioaktiv markierten Oligonucleotiddoppelstrangs, so dass ein sogenannter *band shift* erfolgt und eine distinkte Radioaktivitätsbande mit für den gebildeten Komplex spezifischer Wanderungsstrecke erscheint. Die Spezifität einer solchen Protein-DNA-Interaktion kann durch Konkurrenzexperimente überprüft werden, in denen der radioaktiv markierte Oligonucleotiddoppelstrang durch unmarkierte DNA identischer Sequenz oder andere DNA Oligonucleotide, welche den mutmaßlichen Proteinbindungspartner spezifisch binden, aus der Bindung mit dem Protein verdrängt wird.

3.3.7.1 Interaktion von *in vitro* synthetisiertem HNF4 α 1 mit dem HNF4 α -RE

Alle durchgeführten Transfektionsexperimente deuteten darauf hin, dass das DR1 Motiv 5'-AGTCCC A AGTCCA-3' an Position -75 bis -87 des Promotors des PXR Gens ein HNF4 α *response element* darstellt. Um die direkte Interaktion des DR1 Motivs mit HNF4 α zu überprüfen, wurde ein EMSA durchgeführt (Abbildung 23). Als Proteinfraction wurde *in vitro*-synthetisiertes HNF4 α 1 Protein eingesetzt, welches mit dem TNT Quick coupled Transcription/Translation Kit (Promega) unter Verwendung des Expressionsplasmids pcDhuHNF4 α 1 hergestellt worden war. Als Kontrollproteinfraction wurde TNT Reaktionsprodukt verwendet, bei dem der leere Expressionsvektor pcDNA3 eingesetzt worden war.

Als Positivkontrolle für die erfolgreiche *in vitro*-Synthese des HNF4 α 1 Proteins und die korrekte experimentelle Durchführung wurde das DR1 Element 5'-TGACCT T TGCCCA-3' aus dem proximalen Promotor des Apolipoprotein CIII Gens apoCIII verwendet, dessen Interaktion mit HNF4 α bekannt ist (Ldias et al., 1992; Mietus-Snyder et al., 1992) (Spur 2). Wie in den Spuren 4 und 5 zu sehen ist, bindet HNF4 α 1 an das mutmaßliche HNF4 α -RE 5'-AGTCCC A AGTCCA-3'. Die Spezifität dieser Bindung wird durch Konkurrenz mit steigenden Mengen des nicht radioaktiv markierten HNF4 α -RE belegt (Spuren 6 bis 9). Das radioaktiv markierte HNF4 α -RE kann auch durch das nicht radioaktiv markierte DR1 Motiv aus dem apoCIII Promotor aus der Bindung an HNF4 α 1 Protein verdrängt werden (Spuren 10 bis 13), nicht jedoch durch das mutierte *response element* HNF4 α -REmut 5'-AAACCC A AAACCA-3' (Spuren 14 bis 17), welches in den Transfektionsexperimenten im Kontext des Reportergenkonstrukts pGL3-PXR(-191/-84A>T;-

83C>T;-77A>T;-76C>T) eine verringerte oder keine Aktivierbarkeit der Promotoraktivität durch Co-Transfektion von HNF4 α 1 mehr zeigte. In Übereinstimmung damit findet auch keine Bindung des HNF4 α 1 Proteins an das mutierte DR1 Motiv HNF4 α -REmut statt (Spur 19). HNF4 α 1 bindet im EMSA also spezifisch an das DR1 Motiv und HNF4 α -RE 5'-AGTCCC A AGTCCA-3', das an Position -75 bis -87 im Promotors des PXR Gens vorliegt.

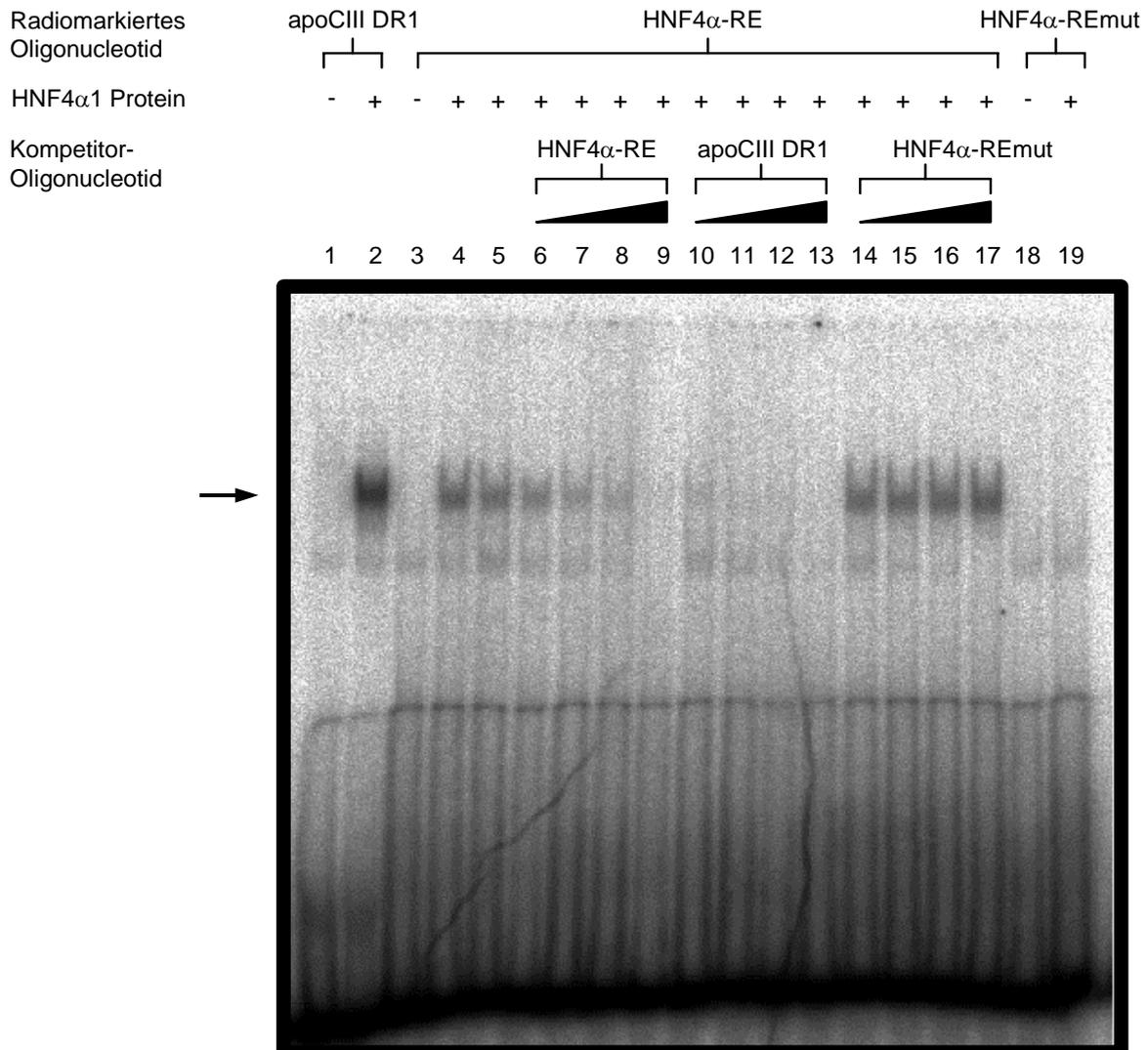


Abbildung 23. Electrophoretic mobility shift assay mit jeweils 2 μ l *in vitro*-synthetisiertem HNF4 α 1.

Protein (+) oder Kontrollreaktionsprodukt (-) und 50000 cpm [32 P]-markierten Oligonucleotidelementen apoCIII DR1 (Positivkontrolle), HNF4 α -RE und HNF4 α -REmut nach 2 h Elektrophorese im 5%igen Polyacrylamidgel. HNF4 α 1 bindet spezifisch an das HNF4 α -RE, nicht aber an das mutierte DR1 Motiv HNF4 α -REmut. Die Bindung an das HNF4 α -RE lässt sich durch steigende Mengen von nicht radioaktiv markiertem apoCIII DR1 und HNF4 α -RE kompetieren.

3.3.7.2 Interaktion von HNF4 α aus Kernextrakten mit dem HNF4 α -RE

Um zu untersuchen, ob nicht nur *in vitro*-synthetisiertes HNF4 α 1 Protein, sondern auch natives HNF4 α Protein mit dem HNF4 α -RE im EMSA interagiert, wurde ein *super shift* Experiment durchgeführt, bei dem als Proteinfraction Kernextrakte aus LS174T, HepG2, HeLa, COS-1 und zusätzlich aus CaCo2 Zellen verwendet wurden.

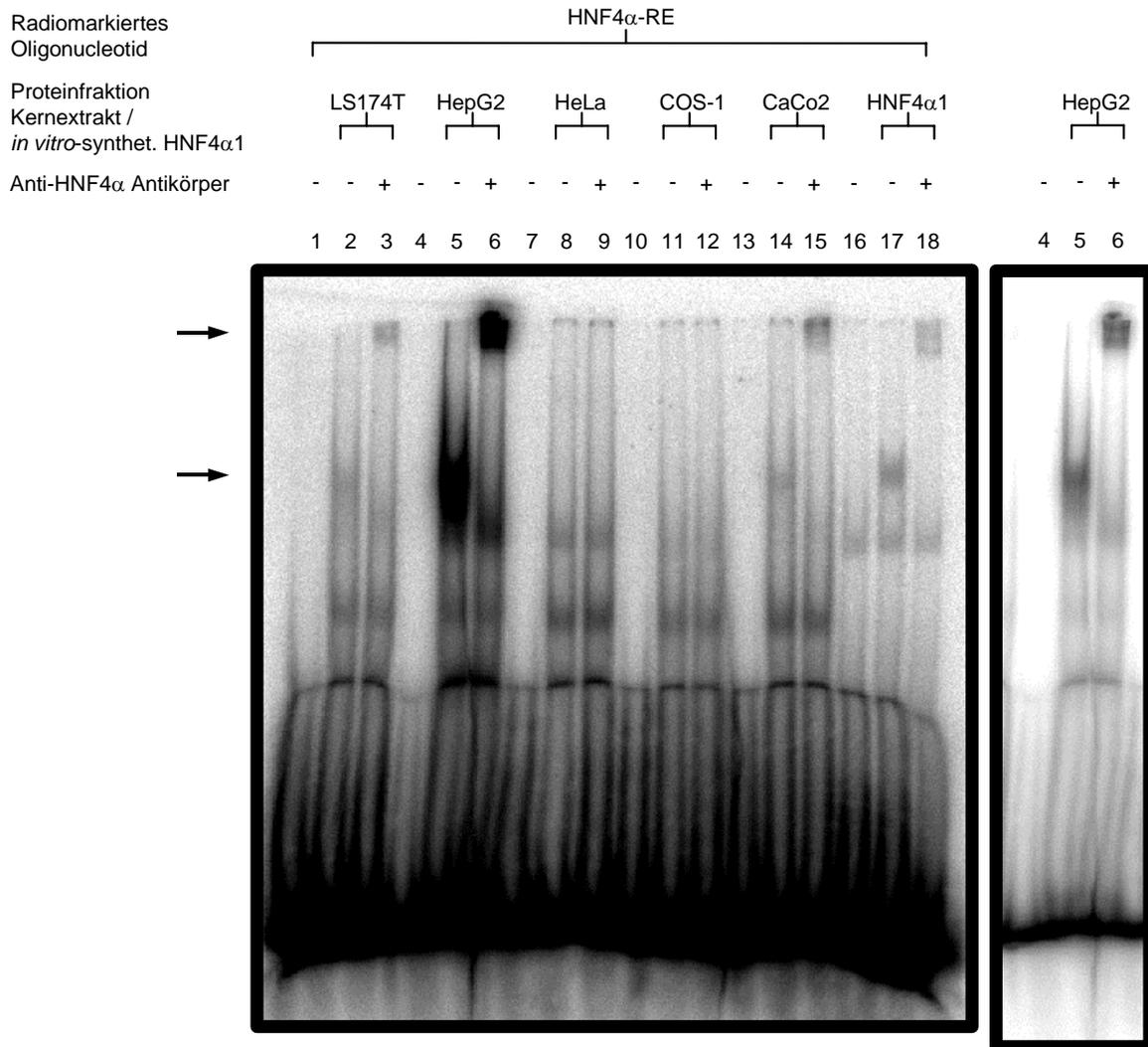


Abbildung 24. Electrophoretic mobility super shift assay im 5%igen Polyacrylamidgel mit je 5-10 μ g Kernextrakt bzw. 2 μ l *in vitro*-synthetisiertem HNF4 α 1 und 50.000 cpm Radiooligonucleotid.

Bei Kernextrakten der Zelllinien LS174T, HepG2 und CaCo2 co-migriert bei der Inkubation ohne anti-HNF4 α Antikörper jeweils eine Bande mit dem Komplex aus dem HNF4 α -RE und dem *in vitro*-synthetisierten HNF4 α 1-Protein. Mit Kernextrakten aus HeLa und COS-1 Zellen sind keine co-migrierenden Banden zu erkennen. Bei Inkubationen mit anti-HNF4 α Antikörper findet eine weitere Verschiebung der Banden (*super shift*) sowohl beim Ansatz mit *in vitro*-synthetisiertem HNF4 α 1 als auch bei den Kernextrakten aus LS174T, HepG2 und CaCo2 Zellen statt. In diesen Zelllinien vorhandenes HNF4 α bindet also an das HNF4 α -RE.

Zur Kontrolle der experimentellen Durchführung wurde ebenfalls *in vitro*-synthetisiertes HNF4 α 1 Protein mitgeführt. Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, fand eine Bindung des *in vitro*-synthetisierten HNF4 α 1 Proteins an das HNF4 α -RE statt (Spur 17), bei Inkubation mit dem anti-HNF4 α Antikörper findet eine weitere Verschiebung (*super shift*) statt, der Komplex aus dem radiomarkierten HNF4 α -RE, HNF4 α 1 und dem Antikörper migrierte deutlich verlangsamt durch das Gel (Spur 18). Bei den Inkubationen mit Kernextrakten ist zu erkennen, dass, besonders deutlich bei den Kernextrakten aus HepG2 Zellen (Spur 5), aber auch bei den Kernextrakten aus LS174T (Spur 2) und CaCo2 (Spur 14) Zellen eine Interaktion zwischen Proteinen des Kernextrakts und dem HNF4 α -RE stattfindet, die resultierenden Banden befinden sich auf derselben Höhe wie die Bande mit HNF4 α 1. Bei den Inkubationen mit anti-HNF4 α Antikörper findet eine weitere Verschiebung dieser Banden (Spur 3, 6, 15) durch die langsamere Wanderungsgeschwindigkeit des antikörpergebundenen Komplexes statt, wobei auf der Laufhöhe des nicht-antikörpergebundenen Komplexes jeweils kein Signal mehr zu erkennen ist. Dies bedeutet, dass das HNF4 α -RE im EMSA von Proteinen, die im Kernextrakt von LS174T, HepG2 und CaCo2 vorliegen, gebunden wird, und dass es sich bei dem Bindungspartner ausschließlich um HNF4 α handelt. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen aus den Transfektionsexperimenten überein, bei denen die basale Promotoraktivität der PXR-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte in LS174T und HepG2 Zellen durch Zerstörung des HNF4 α -RE bei -75 bis -87 durch ortsgerichtete Mutagenese erheblich verringert wurde. Gewissermaßen als Negativkontrolle wurden die Kernextrakte aus HeLa bzw. COS-1 Zellen verwendet, da diese Zelllinien kein HNF4 α exprimieren. Im Gegensatz zu den Kernextrakten aus LS174T, HepG2 und CaCo2-Zellen tritt bei den Inkubationen mit Kernextrakt aus HeLa (Spur 8) oder COS-1 (Spur 11) Zellen keine Bande auf Höhe der Positivkontrollbande auf und bei den Inkubationsansätzen mit anti-HNF4 α Antikörper findet folgerichtig keine Veränderung oder Verschiebung von Signalen statt (Spuren 9 und 12). D.h. in den Kernextrakten von HeLa und COS-1 Zellen liegen keine Proteine vor, die eine Bindung mit dem HNF4 α -RE eingehen. Dies steht ebenfalls mit den Ergebnissen der Transfektionsexperimente in Übereinstimmung, in denen die basale Promotoraktivität in HeLa und COS-1 Zellen nicht vom HNF4 α -RE bei -75 bis -87 abhängig war, durch Co-Transfektion von HNF4 α 1, d.h. Zufuhr von exogenem HNF4 α , jedoch eine starke Erhöhung der Promotoraktivität der Reporter-Gen-Konstrukte erzielt werden konnte.

3.3.8 Einfluss des HNF4 α -RE auf die Aktivität des Thymidinkinaseminimalpromotors

In den Transfektionsexperimenten war die Responsivität der Reporter-genkonstrukte gegenüber HNF4 α 1 in den Zelllinien, in denen eine deutliche Steigerung der Promotoraktivität zu sehen war, d.h. in COS-1 und HeLa-Zellen, vom Vorhandensein des an Position -75 bis -87 gelegenen HNF4 α *response element* abhängig. Um die Fähigkeit dieses DR1 Motivs zu untersuchen, eine Verstärkung der Promotoraktivität durch Co-Transfektion von HNF4 α 1 unabhängig vom Kontext des PXR-Promotors auch im Zusammenspiel mit einem heterologen Promotor zu vermitteln, wurden von dem HNF4 α *response element* Multimer hergestellt und diese vor den Promotorbereich des Reporter-genkonstruktes pGL3-TK(-105) inseriert, bei dem der Sequenzbereich von -105 bis +51 relativ zum Transkriptionsstartpunkt des Thymidinkinasegens (Thymidinkinaseminimalpromotor) vor das Reporter-gen Luciferase kloniert ist. Es wurden ein Dimer und ein Pentamer des HNF4 α -RE synthetisiert und jeweils vor den Thymidinkinaseminimalpromotor inseriert. Die beiden Konstrukte, pGL3-bisHNF4 α -RE-TK(-105) und pGL3-pentakisHNF4 α -RE-TK(-105) wurden auf ihre basale Promotoraktivität und ihre Aktivierbarkeit durch Co-Transfektion von HNF4 α 1 in COS-1 als Zelllinie, in der eine starke Aktivierung durch HNF4 α 1 durch das HNF4 α -RE im Kontext des PXR-Promotors vermittelt wird, und in LS174T als Zelllinie, in der nur eine geringe Aktivierung durch HNF4 α 1 Co-Transfektion auftrat, untersucht.

3.3.8.1 Einfluss des HNF4 α -RE auf die Promotoraktivität in COS-1 Zellen

Das Reporter-genkonstrukt pGL3-TK(-105), welches nur den Thymidinkinaseminimalpromotor enthält, zeigte in COS-1 Zellen eine basale Aktivität, die ungefähr 14-fach höher war als die des Leervektors pGL3-Basic (Abbildung 25). Die Aktivitäten der Konstrukte pGL3-bisHNF4 α -RE-TK(-105) und pGL3-pentakis-HNF4 α -RE-TK(-105) lagen mit knapp 17-fach bzw. knapp 20-fach stärker als pGL3-Basic nur geringfügig über der Basalaktivität von pGL3-TK(-105), was aufgrund der fehlenden Expression von HNF4 α in den COS-1 Zellen plausibel erscheint. Wurde das Expressionsplasmid pcDhuHNF4 α 1 co-transfiziert, so wurde die Promotoraktivität von pGL3-TK(-105) ungefähr vervierfacht, bei den Konstrukten mit dem HNF4 α -RE Dimer bzw. Pentamer erhöhte sich die Promotoraktivität jeweils um einen Faktor von ungefähr 12. Die Responsivität der Konstrukte mit HNF4 α -RE Multimeren war also ungefähr dreimal stärker.

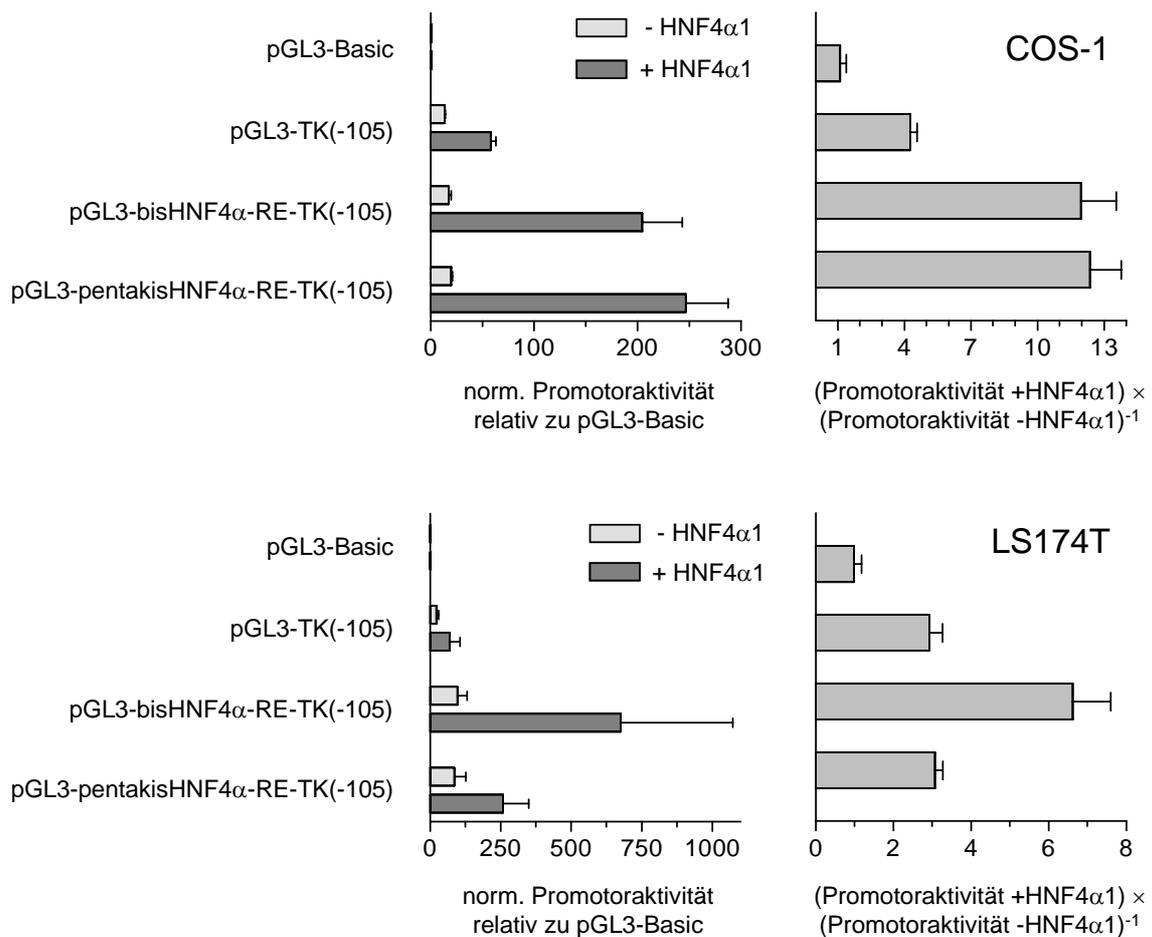


Abbildung 25. Transiente Transfektion von Thymidinkinasepromotor-Reportergenkonstrukten mit und ohne inserierte Multimere des HNF4 α *response element* in COS-1 (oben) und LS174T (unten) Zellen. In COS-1 Zellen ist die basale Aktivität aller Konstrukte gleich stark, die Aktivität des Thymidinkinasepromotors selbst (pGL3-TK(-105)) ist durch HNF4 α 1 Co-Transfektion um den Faktor drei, die der Konstrukte mit HNF4 α -RE Multimeren um den Faktor 12 erhöht. In LS174T Zellen ist die basale Aktivität der Konstrukte mit HNF4 α -RE Multimeren ungefähr vierfach höher als die des Thymidinkinasepromotorkonstrukts. Dessen Aktivität und die des Konstrukts mit dem HNF4 α -RE Pentamer ist bei HNF4 α 1 Co-Transfektion um den Faktor 3, die Aktivität des Dimerkonstrukts um den Faktor 6,5 erhöht.

3.3.8.2 Einfluss des HNF4 α -RE auf die Promotoraktivität in LS174T Zellen

In den LS174T Zellen war die basale Aktivität des pGL3-TK(-105) Konstrukts um den Faktor 23 und damit deutlich höher als die von pGL3-Basic (Abbildung 25). Die Konstrukte mit den HNF4 α -RE Multimeren pGL3-bisHNF4 α -RE-TK(-105) (~97-fach) und pGL3-pentakisHNF4 α -RE-TK(-105) (~87-fach) zeigten eine ungefähr vierfach höhere basale Promotoraktivität als das Konstrukt pGL3-TK(-105), was angesichts der Expression von HNF4 α in LS174T Zellen plausibel ist. Bei der Co-Transfektion von pcDhuHNF4 α 1 war die Aktivität des Thymidinkinasepromotors in pGL3-

TK(-105) um den Faktor drei gesteigert, die Promotoraktivität von pGL3-bisHNF4 α -RE-TK(-105) erhöhte sich auf das 6,5-fache. Die Aktivität des Konstrukts pGL3-pentakisHNF4 α -RE-TK(-105) war ebenfalls erhöht, jedoch nur um den Faktor 3, d.h. ungefähr im gleichen Ausmaß wie die von pGL3-TK(-105).

In beiden verwendeten Zelllinien ist also der Thymidinkinasepromotor bereits selbst durch HNF4 α 1 aktivierbar. Dies erscheint plausibel, da im Promotorbereich des verwendeten Reportergenkonstruktes pGL3-TK(-105) DR1 Motive mit guter Übereinstimmung zum HNF4 α -RE Konsensusmotiv RGDBYA R RGKBYN vorliegen (1 DR1 Motiv mit einem *mismatch* und 4 DR1 Motive mit zwei *mismatches*). Dennoch wird die Responsivität gegenüber HNF4 α 1 durch die Insertion von HNF4 α -Multimeren im Fall des Konstrukts pGL3-bisHNF4 α -RE-TK(-105) in beiden untersuchten Zelllinien verstärkt. Beim Konstrukt pGL3-pentakisHNF4 α -RE-TK(-105) tritt diese erhöhte Responsivität nur in COS-1 Zellen auf, nicht aber in den LS174T Zellen. Insgesamt betrachtet ist das HNF4 α *response element* also in der Lage auch losgelöst vom Kontext des Promotors des PXR Gens eine Responsivität gegenüber HNF4 α 1 zu vermitteln oder zu verstärken.

3.3.9 Aktivität von PXR-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten bei Co-Transfektion von COUP-TFI und COUP-TFII

Es ist bekannt, dass der Effekt von HNF4 auf die Transkription einer Reihe von Genen durch COUP-TF reprimiert oder moduliert wird (Ladias et al., 1992; Mietus-Snyder et al., 1992; Kimura et al., 1993; Galson et al., 1995; Cairns et al., 1996). Außerdem wurde gezeigt, dass COUP-TFs an Bindungsmotive vom DR1 Typ binden können, so z.B. in den proximalen Promotoren von CYP2D6 (Cairns et al., 1996) und des *Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor α* (Pineda Torra et al., 2002), und dass sie mit HNF4 α um Elemente vom DR1 Typ konkurrieren können (Sladek, 1994). Daher wurde der Effekt einer Co-Transfektion von COUP-TFI oder COUP-TFII auf die Aktivität von ausgewählten PXR-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten untersucht. Die Experimente wurden in LS174T Zellen durchgeführt, da in diesen eine hohe basale Aktivität der PXR-Promotorkonstrukte vorliegt (vgl. Abschnitt 3.3.4) und so eine mutmaßliche Repression oder Modulation der Aktivitäten gut untersucht werden konnte.

Die verwendeten Konstrukte zeigten im Vergleich mit den in Abschnitt 3.3.4 beschriebenen Daten qualitativ und quantitativ nahezu identische basale Aktivitäten, mit einer stetigen, geringen Abnahme vom Konstrukt mit dem größten Promotorfragment pGL3-PXR(-2543) bis zum Konstrukt pGL3-PXR(-129) und einem starken Abfall der Aktivität bei pGL3-PXR(-71) (Abbildung 26). Die Konstrukte mit mutierten DR1 Motiven verhielten sich analog wie in Abschnitt 3.3.6 beschrieben.

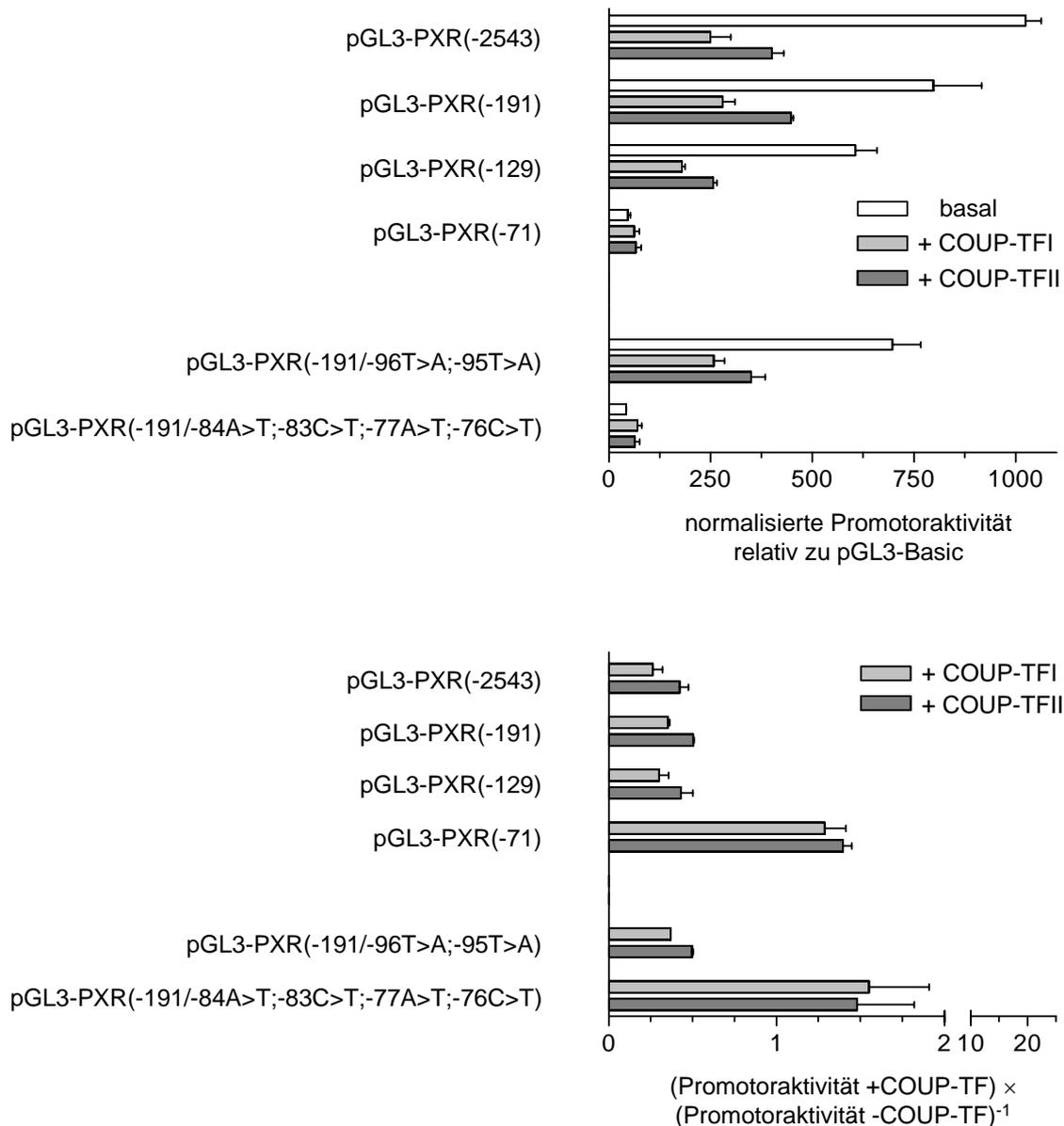


Abbildung 26. Co-Transfektion von LS174T Zellen mit 150 ng Reportergenkonstrukt, 20 ng pCMV β und 30 ng pcDNA3 (basal), 30 ng pcDhuCOUP-TFI (+COUP-TFI) oder 30 ng pcDhuCOUP-TFII (+COUP-TFII).

Oben: Basale normalisierte Reportergenaktivitäten relativ zu pGL3-Basic aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils als Dreifachwerte durchgeführt worden waren. Unten: Induktion der Reportergenaktivität bei Co-Transfektion mit COUP-TFI oder COUP-TFII dargestellt als Quotient der normalisierten, relativen Luciferaseaktivitäten bei Co-Transfektion mit COUP-TFI oder COUP-TFII dividiert durch die normalisierten, relativen Luciferaseaktivitäten bei Co-Transfektion mit leerem Expressionsvektor. Bis zum Konstrukt pGL3-PXR(-129) ist die Promoteraktivität durch COUP-TF reprimierbar, die Zerstörung des funktionellen HNF4 α -RE führt zum Verlust der Repression.

Durch die Co-Transfektion von Expressionsplasmiden für COUP-TFI oder COUP-TFII verringerten sich die Promotoraktivitäten der Konstrukte pGL3-PXR(-2543), pGL3-PXR(-191), pGL3-PXR(-129)

und pGL3-PXR(-191/-96T>A;-95T>A). Bei Co-Transfektion von COUP-TFI wurden die Aktivitäten auf ungefähr 25 bis 30% reprimiert, bei Co-Transfektion von COUP-TFII auf ca. 40 bis 50% der basalen Aktivitäten. Dagegen ist bei den Konstrukten pGL3-PXR(-71), welches das HNF4 α *response element* nicht mehr enthält, und pGL3-PXR(-191/-84A>T;-83C>T;-77A>T;-76C>T), bei dem das HNF4 α -RE mutiert vorliegt und keine Aktivierung durch HNF4 α 1 mehr stattfindet, kein reprimierender Effekt durch COUP-TFI oder COUP-TFII mehr zu erkennen, es scheint sogar eine schwache Aktivierung um etwa 30-50% stattzufinden.

Sowohl COUP-TFI als auch COUP-TFII üben also eine reprimierende Wirkung auf den PXR Promotor aus, welche vom Vorhandensein des intakten HNF4 α -RE abhängig zu sein scheint. Die Repression durch COUP-TFI ist dabei im Vergleich zu COUP-TFII durchgehend etwas ausgeprägter. Ob es sich um eine direkte Interaktion, d.h. eine Bindung von COUP-TFI oder COUP-TFII selbst an das HNF4 α -RE, oder eine indirekte Interaktion, z.B. vermittelt durch eine Protein-Protein-Interaktion mit einem Faktor, der an das HNF4 α -RE bindet, kann nicht entschieden werden.

3.3.10 Interaktion von COUP-TFI und COUP-TFII mit dem HNF4 α -RE im *Electrophoretic Mobility Shift Assay*

Da der reprimierende Effekt von co-transfiziertem COUP-TF I und COUP-TF II durch Mutagenese des HNF4 α *response element* aufgehoben wurde, lag die Vermutung nahe, dass die reprimierende Wirkung durch eine direkte Bindung von COUP-TF I bzw. COUP-TF II an das HNF4 α -RE zustande kommt. Um eine direkte Bindung zu überprüfen wurde ein *electrophoretic mobility shift assay* durchgeführt (Abbildung 27). Als Proteinfractionen wurden *in vitro*-synthetisiertes COUP-TFI oder COUP-TFII verwendet, welche mit dem TNT Quick coupled Transcription/Translation Kit (Promega) unter Einsatz der Expressionsplasmide pcDhuCOUP-TFI bzw. pcDhuCOUP-TFII hergestellt worden waren. Als Kontrollproteinfraction wurde Reaktionsprodukt verwendet, bei dem der leere Expressionsvektor pcDNA3 eingesetzt worden war.

Sowohl das *in vitro*-synthetisierte COUP-TF I Protein (Spur 2) als auch das COUP-TF II Protein (Spur 3) zeigten im Positivkontrollexperiment eine Bindung an ein DR4 Motiv aus dem Promotor des MDR1 Gens, welches COUP-TFs bindet (persönliche Mitteilung O. Burk). Jedoch banden weder COUP-TF I (Spur 5) noch COUP-TF II (Spur 8) an das HNF4 α *response element* aus dem PXR Promotor. Da bei der Experimentplanung von einer Bindung von COUP-TF I oder COUP-TF II an das HNF4 α -RE ausgegangen worden war, wurde im selben Experiment auch eine Kompetition der Bindung von COUP-TF I (Spuren 6 und 7) und COUP-TF II (Spuren 9 und 10) an das radioaktiv markierte HNF4 α -RE mit nicht markiertem HNF4 α -RE überprüft. Da jedoch ohnehin keine Bindung von COUP-TF I oder COUP-TF II an das HNF4 α -RE stattfand, ergibt sich folgerichtig keine

Änderung der Signale. Auch konnte keine Bindung von COUP-TF I (Spur 12) oder COUP-TF II (Spur 13) an das mutierte DR1 Motiv HNF4 α -REmut gezeigt werden.

Radiomarkiertes Oligonucleotid	MDR1 DR4			HNF4 α -RE				HNF4 α -REmut					
COUP-TF I Protein	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
COUP-TF II Protein	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
Kompetitor- Oligonucleotid					HNF4 α -RE		HNF4 α -RE						
					▲		▲						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

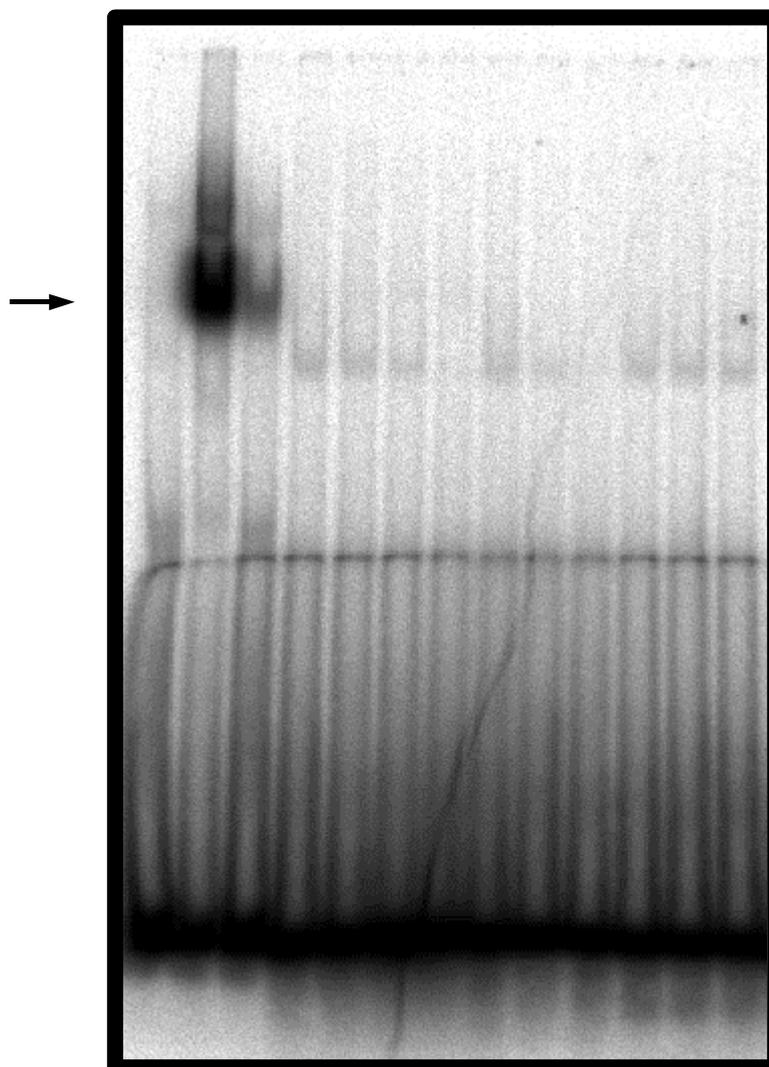


Abbildung 27. *Electrophoretic mobility shift assay* mit jeweils 2 μ l *in vitro*-synthetisiertem COUP-TFI oder COUP-TFII Protein (+) oder Kontrollreaktionsprodukt (-) und 50000 cpm [32 P]-markierten Oligonucleotidelementen MDR1 DR4 (Positivkontrolle), HNF4 α -RE und HNF4 α -REmut nach 2 h Elektrophorese im 5%igen Polyacrylamidgel. Weder COUP-TFI noch COUP-TFII binden an das HNF4 α -RE.

3.3.11 Aktivität von PXR-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten bei Co-Transfektion von PXR und Behandlung mit Rifampicin

In biologischen Systemen sind autoregulatorische Regelkreise verbreitet, um einerseits eine starke, überschüssige oder adäquate Antwort auf einen Stimulus zu ermöglichen (positive Autoregulation) oder gegenseitig eine Überreaktion bzw. überschüssige Antwort zu vermeiden oder eine Homöostase aufrechtzuerhalten (negative Autoregulation). Ein derartiger Regulationsmechanismus ist generell auch für die Expressionsregulation von PXR denkbar, um beispielsweise bei starker Exposition gegenüber exogenen oder endogenen Liganden durch vermehrte PXR Expression eine entsprechend starke, ausreichende Modulierung der Expression der Gene, die unter der transkriptionellen Kontrolle von PXR stehen, bewirken zu können. Ein Indiz für eine solche Autoregulation war die beobachtete Induktion der PXR mRNA Expression in der Leber von Mäusen, die mit dem in Mäusen aktiven PXR Liganden PCN behandelt worden waren (Maglich et al., 2002).

Um die mögliche Autoregulation von PXR zu untersuchen wurde der Einfluß einer Co-Transfektion des PXR-Expressionsplasmids pcDhuPXR auf die Promotoraktivität des Konstrukts pGL3-PXR(-2543), sowie der Einfluß einer Behandlung mit 10 µM Rifampicin sowohl mit als auch ohne gleichzeitige Co-Transfektion des PXR Expressionsplasmids in LS174T Zellen untersucht.

Die Aktivität des als Positivkontrolle eingesetzten Reporter-Gen-Konstrukts pGL3-CYP3A4(-7830/Δ7208-364) (Hustert et al., 2001b) wird durch Co-Transfektion des PXR Expressionsplasmids ungefähr dreifach erhöht (Abbildung 28 oben), die Rifampicinbehandlung mit und ohne Co-Transfektion von PXR bewirkt eine Verstärkung der Promotoraktivität um den Faktor sieben (Abbildung 28 unten). Dagegen veränderte sich die Aktivität des Reporter-Gen-Konstrukts pGL3-PXR(-2543) weder durch Co-Transfektion von PXR noch durch die Behandlung der LS174T Zellen mit 10 µM Rifampicin. Im Bereich bis -2543 stromaufwärts vom Transkriptionsstart scheinen also keine *cis-acting* Elemente vorzuliegen, die einen autoregulatorischen Einfluss von PXR vermitteln, vorzuliegen.

3.3.12 Aktivität von PXR-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten bei Co-Transfektion von GR α und Behandlung mit Dexamethason

Im Rahmen einer Untersuchung zur Induktion von CYP3A4 durch Dexamethason war von einer Induktion des PXR mRNA Expressionsniveaus in humanen Hepatocyten bei Behandlung mit Dexamethason berichtet worden (Pascussi et al., 2000a) und eine direkte Regulation der Transkription des PXR Gens durch den Glucocorticoidrezeptor vorgeschlagen worden. Um diese Hypothese anhand des in dieser Arbeit subklonierten Bereichs der 5' flankierenden Region des PXR Gens zu untersuchen, wurden Co-Transfektionsexperimente mit ausgewählten Reporter-Gen-Konstrukten und einem Glucocorticoidrezeptor-Expressionsplasmid sowohl mit als auch ohne Dexamethasonbehandlung in COS-1 Zellen durchgeführt.

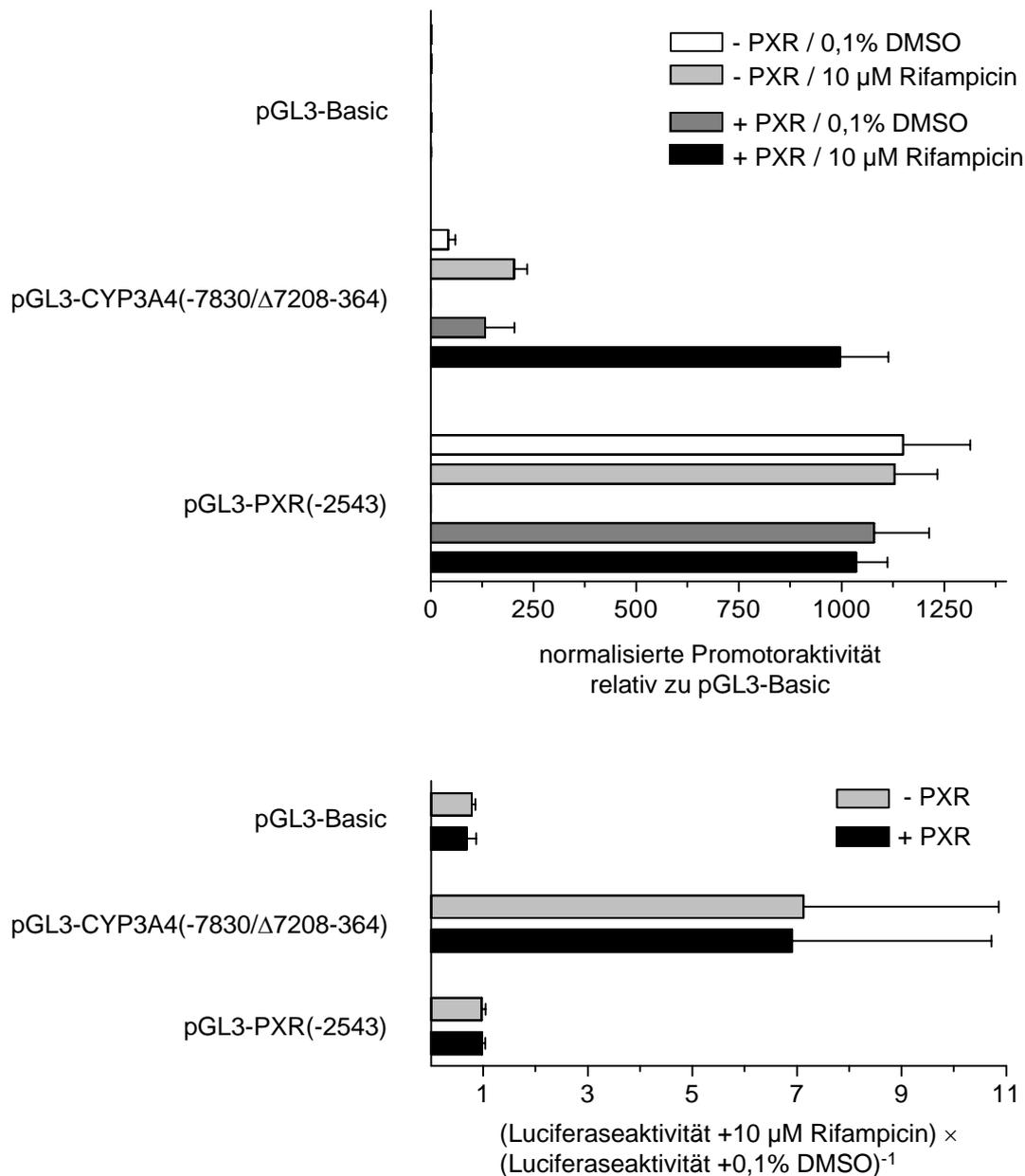


Abbildung 28. Untersuchung der Autoregulation von PXR in LS174T Zellen.

Co-Transfektion von 150 ng Reportergenkonstrukt, 20 g pCMV β und 0,1 ng Expressionsplasmid pcDhuPXR (+PXR) oder 0,1 ng leerem Expressionsvektor pcDNA3 (-PXR) und Behandlung mit 10 μ M Rifampicin. Oben: Mittelwert der normalisierte Luciferaseaktivitäten relativ zu pGL3-Basic aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils als Triplikate durchgeführt worden waren. Unten: Induktion der Reportergenaktivitäten durch Behandlung mit 10 μ M Rifampicin mit und ohne Co-Transfektion von exogenem PXR, dargestellt als Quotient der normalisierten, relativen Luciferaseaktivitäten mit Rifampicinbehandlung geteilt durch die normalisierten, relativen Luciferaseaktivitäten ohne Rifampicinbehandlung.

Die Aktivität des Positivkontrollkonstrukts pGL3-CYP3A4(-7830/ Δ 7208-364) lässt sich durch PXR Co-Transfektion und/oder Rifampicinbehandlung erhöhen, das PXR-Promotor-Reportergen-Konstrukt pGL3-PXR(-2543) ist refraktär sowohl gegenüber PXR Co-Transfektion als auch gegenüber Rifampicinbehandlung.

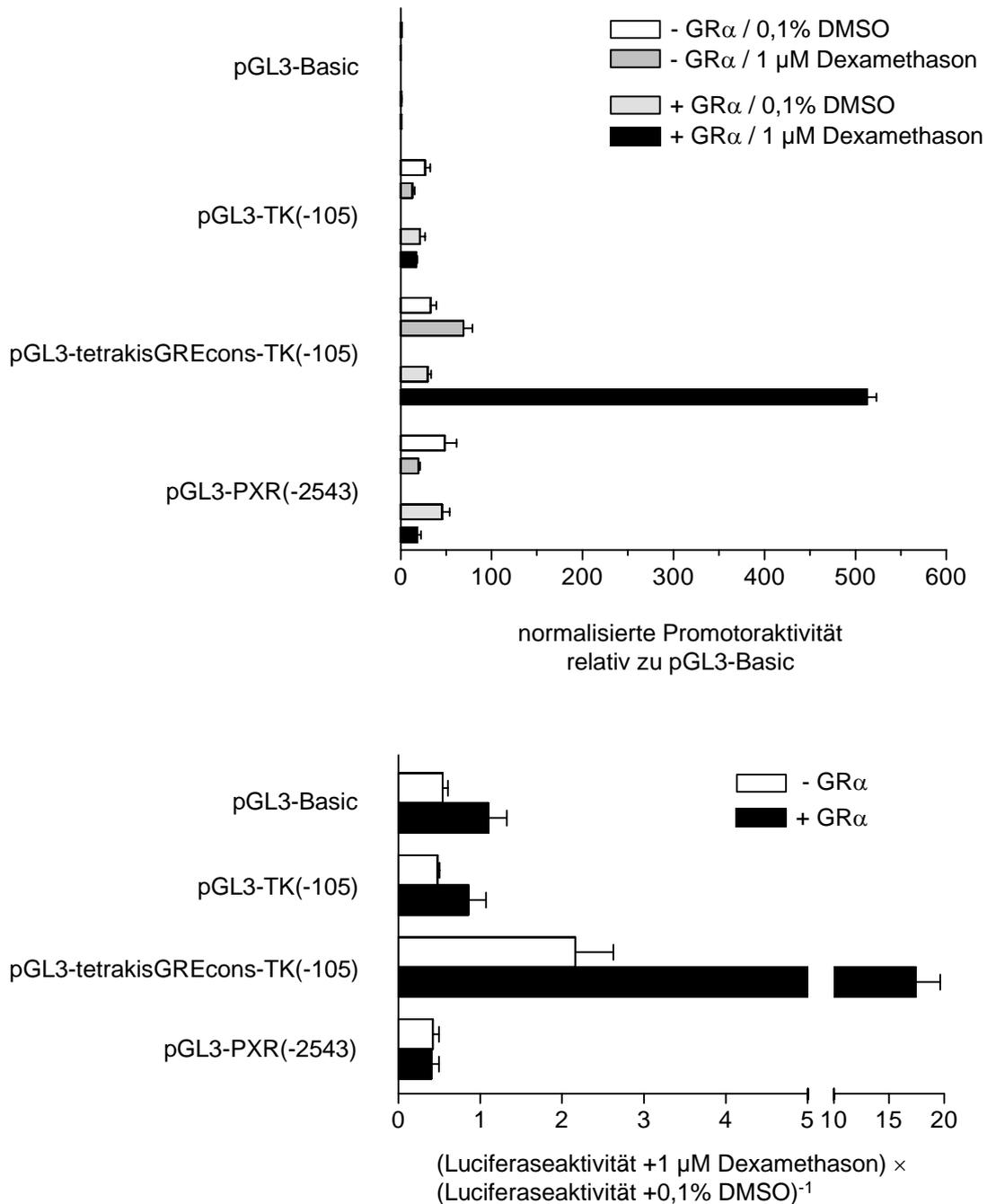


Abbildung 29. Untersuchung der transkriptionellen Regulation von PXR durch GR α in COS-1 Zellen. Co-Transfektion von 150 ng Reporter-genkonstrukt, 20 g pCMV β und 10 ng Expressionsplasmid pcDhuGR α (+GR α) oder 10 ng pcDNA3 (-GR α) und Behandlung mit 1 μ M Dexamethason. Oben: Mittelwert der normalisierte Luciferaseaktivitäten relativ zu pGL3-Basic aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils als Triplikate durchgeführt worden waren. Unten: Induktion der Reporter-genaktivitäten durch Behandlung mit 1 μ M Dexamethason mit und ohne Co-Transfektion von exogenem GR α , dargestellt als Quotient der Luciferaseaktivitäten mit und ohne Dexamethasonbehandlung.

Die Aktivität des Positivkontrollkonstruktes pGL3-tetrakisGREcons-TK(-105) lässt sich durch Behandlung mit 1 μ M Dexamethason mit und ohne GR α Co-Transfektion steigern. Die Aktivität von pGL3-PXR(-2543) wird jeweils leicht reprimiert.

Um eine prinzipiell erfolgreiche Induktion einer Promotoraktivität durch Behandlung mit Dexamethason nachzuweisen wurde als Positivkontrolle das Reportergenkonstrukt pGL3-tetrakisGREcons-TK(-105) generiert, bei dem ein Tetramer des Konsensus-*glucocorticoid response element* (GRE) der Sequenz GGTACA GAG TGTTCT (Stafford et al., 2001) vor den Thymidinkinase minimalpromotor inseriert wurde. Wie in Abbildung 29 zu ersehen ist, liess sich die Promotoraktivität des Konstrukts pGL3-tetrakisGREcons-TK(-105) ohne Co-Transfektion des Glucocorticoidrezeptor-Expressionsplasmids pcDhuGR α durch Behandlung mit 1 μ M Dexamethason um den Faktor 2 steigern, bei Co-Transfektion von pcDhuGR α sogar um einen Faktor von ungefähr 15. Um zu verifizieren, dass die Aktivierung des Konstrukts pGL3-tetrakisGREcons-TK(-105) durch Dexamethason bzw. den Glucocorticoidrezeptor tatsächlich durch das inserierte GRE-Tetramer bewirkt wird, wurde der Einfluss von Dexamethason mit und ohne Co-Transfektion von pcDhuGR α auf den Thymidinkinase minimalpromotor im Konstrukt pGL3-TK(-105) untersucht. Die Behandlung mit 1 μ M Dexamethason führte bei diesem Konstrukt weder mit noch ohne Co-Transfektion von pcDhuGR α zu einer erhöhten Promotoraktivität, so dass die Induktion beim Konstrukt pGL3-tetrakisGREcons-TK(-105) als valide Positivkontrolle für eine GRE-vermittelte Induktion angesehen werden kann. Zur Untersuchung des Einflusses von Dexamethason bzw. des Glucocorticoidrezeptors auf den PXR Promotor wurde das Reportergenkonstrukt pGL3-PXR(-2543) verwendet. Es zeigte sich, dass die Dexamethasonbehandlung sowohl ohne als auch mit Co-Transfektion des GR α -Expressionsplasmids nicht zu einer Erhöhung der Promotoraktivität des pGL3-PXR(-2543) Konstrukts sondern vielmehr zu einer Reprimierung um ungefähr 50% führte.

4 DISKUSSION

4.1 Expressionsanalyse des Cytochrom P450 3A4 und des Pregnan-X-Rezeptors

4.1.1 Geschlechtsabhängig dimorphe Expression des Cytochrom P450 3A4

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem Probenkollektiv von 94 Leberproben ein signifikanter Unterschied in der Expression des Cytochroms P450 3A4 zwischen Männern und Frauen gefunden.

Das Phänomen der geschlechtsabhängig dimorphen Expression von Genen sowohl beim Tier als auch beim Menschen ist lange bekannt und geht bis in Jahr 1934 zurück (Nicholas, 1934). Für das Gebiet des Fremdstoffmetabolismus existiert eine Vielzahl von Untersuchungen zu diesem Sachverhalt (Harris et al., 1995; Mugford et al., 1998; Beierle et al., 1999; Tanaka, 1999; Meibohm et al., 2002). Die Ergebnisse der durchgeführten Studien sind nicht immer eindeutig, teilweise sind sie aufgrund experimenteller oder methodischer Probleme nur mit Vorsicht interpretierbar, teilweise widersprechen sich die Daten verschiedener Studien und teilweise existieren Unterschiede für einzelne Gene nur bei z.B. der Clearance bei *in vivo* Untersuchungen oder nur bei der enzymatischen Aktivität, nicht aber bei der Proteinexpression desselben Gens oder umgekehrt. Weitgehend unumstritten sind die Befunde, dass Männer eine höhere CYP1A2 Enzymaktivität (Relling et al., 1992; Bock et al., 1994) und dass Frauen eine etwas höhere CYP2D6 Aktivität besitzen (Labbe et al., 2000; Hagg et al., 2001). Für viele weitere Proteine aller drei Phasen des Fremdstoffmetabolismus liegen insgesamt entweder zu wenige, widersprüchliche oder ausschließlich Daten aus Tiermodellen vor, die nur unter Vorbehalt auf den Menschen übertragbar sind.

Männer und Frauen unterscheiden sich in einer Reihe von physiologischen Parametern, die die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Wirkstoffen beeinflussen können. Hierzu zählen Unterschiede beim durchschnittlichen Körpergewicht, bei der Körperzusammensetzung (Muskelmasse, Fettanteil), was zu unterschiedlichen Verteilungsvolumina von v.a. lipophilen Pharmaka führen kann, beim Organblutfluss, aber auch hormonelle Unterschiede mit den damit einhergehenden physiologischen Konsequenzen (Menstruation, Menopause). Dennoch bleiben selbst bei geeigneter Berücksichtigung der geschlechtsspezifisch unterschiedlichen Einflussgrößen die beobachteten geschlechtsabhängigen Unterschiede bestehen.

Es ist bekannt, dass Frauen bei einer Reihe von CYP3A4 Substraten eine höhere Clearance haben als Männer. Zu diesen Substraten zählen unter anderem Cyclosporin (Kahan et al., 1986), Erythromycin (Austin et al., 1980; Watkins et al., 1989), Tirilazad (Hulst et al., 1994), Verapamil (Dilger et al., 1999), Nifedipin (Krecic-Shepard et al., 2000), Diazepam (Greenblatt et al., 1980) und Alfentanil (Lemmens et al., 1990). Ebenso erfolgt bei Frauen eine schnellere Elimination von Prednisolon und

Methylprednisolon als bei Männern (Meffin et al., 1984; Lew et al., 1993). Schließlich wurde vor kurzem berichtet, dass Frauen eine signifikant höhere Exkretion von 6 β -Hydroxycortisol, dem durch CYP3A4 gebildeten Hauptmetaboliten von Cortisol, als Männer besitzen (Inagaki et al., 2002). Die zugrundeliegenden Mechanismen für diese Befunde sind bis dato nicht bekannt.

Zwar wurde in zwei Untersuchungen von höheren mikrosomalen CYP3A Enzymaktivitäten bei Frauen berichtet (Hunt et al., 1992; Schmidt et al., 2001), ein damit übereinstimmender Unterschied bei der Proteinexpression des Cytochrom P450 3A4 in der Leber von Frauen konnte aber nur in einer (Lin, Y. S. et al., 2002) von mehreren Studien festgestellt werden (Schmucker et al., 1990; Shimada et al., 1994; George et al., 1995; Transon et al., 1996). Als alternative Erklärungsmöglichkeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass das P-Glykoprotein (P-gp), das Produkt des *multidrug resistance* Gens MDR1 (ABCB1), für die höhere Clearance bei Frauen verantwortlich ist. Da P-gp unter anderem in der Darmmucosa Substrate aus dem Enterocyten in das Darmlumen und in der Leber Substrate aus dem Hepatocyten in die Gallenkanäle transportiert und die Substratspektren von P-Glykoprotein und CYP3A4 beträchtlich überlappen (Wacher et al., 1995; Schwab et al., 2003) wurde vorgeschlagen, dass Unterschiede in der Expression von P-gp den intrazellulären Pharmakospiegel beeinflussen und somit letztendlich auch die Geschwindigkeit des CYP3A4-abhängigen Fremdstoffmetabolismus (Lan et al., 2000). Tatsächlich wurde in der Leber eine höhere Expression des P-Glykoproteins bei Männern gefunden (Schuetz et al., 1995; Lan et al., 2000), was zu einer geringeren intrazellulären Substratkonzentration und somit, trotz bis dato angenommener nicht unterschiedlicher CYP3A4 Mengen bei Männern und Frauen, zu einem vergleichsweise schnelleren Metabolismus bei Frauen führen könnte. Dieser Mechanismus kann aber bestenfalls nur eine Erklärung für Unterschiede beim Metabolismus von Substanzen liefern, die Substrat von CYP3A4 und des P-Glykoproteins sind. Dies trifft jedoch nur für einige der oben genannten Pharmaka mit geschlechtspezifisch unterschiedlicher Pharmakokinetik zu. So werden z.B. Alfentanil und Nifedipin zwar von Frauen schneller verstoffwechselt als von Männern (Lemmens et al., 1990; Krecic-Shepard et al., 2000), sie sind aber beide kein Substrat des P-Glykoproteins (Cummins et al., 2002; Wandel et al., 2002).

Diese Hypothese kann alleine also nicht alle beobachteten Fälle eines schnelleren Metabolismus von CYP3A4 Substraten bei Frauen erklären. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein erheblicher signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen Expression des Cytochrom P450 3A4 zwischen den Geschlechtern gefunden. In einem Kollektiv von 94 Patienten war die durchschnittliche Proteinexpression des CYP3A4 in der mikrosomalen Fraktion von Lebergewebe von Frauen (n=46) ungefähr doppelt so hoch wie die bei Männern (n=48). In einem Subkollektiv von 39 Patienten, welche vor dem operativen Eingriff keine Medikation einnahmen, war die durchschnittliche Proteinexpression bei Frauen sogar mehr als 2,5 mal so hoch wie bei Männern.

Nur in einer der früheren Untersuchungen zu diesem Thema war ein Unterschied zwischen Männern und Frauen bezüglich der CYP3A4 Proteinexpression gefunden worden. In einem Kollektiv von 60 Leberproben von weißen Probanden war der Median der CYP3A4 Expression innerhalb eines

Subkollektivs von Trägern des CYP3A5 *3/*3 Genotyps, welche 77% des Gesamtkollektivs darstellten, bei Frauen doppelt so hoch wie der von Männern (Lin, Y. S. et al., 2002). Dass in den meisten der bisherigen Untersuchungen kein geschlechtsabhängiger Expressionsunterschied gefunden worden war könnte damit zusammenhängen, dass in drei Studien Antikörper verwendet wurden, die jeweils alle Mitglieder der CYP3A Subfamilie, CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7 detektierten (Schmucker et al., 1990; Shimada et al., 1994; George et al., 1995). Der Anteil des polymorph exprimierten CYP3A5 an der Gesamtexpression der CYP3A Subfamilie ist zwar umstritten (Hustert et al., 2001a; Kuehl et al., 2001), gerade in den zahlenmäßig kleinere Kollektiven von 42 Proben (Transon et al., 1996) und 21 Proben (George et al., 1995) könnte dies dennoch zu einer Verschleierung eines geschlechtsabhängigen Unterschieds geführt haben.

Ein wichtiges Indiz für die geschlechtsdimorphe CYP3A4 Expression ist die Tatsache, dass der Expressionsunterschied zwischen den Geschlechtern auch auf der Ebene der mRNA gefunden wurde. Hier war der Unterschied nicht so ausgeprägt wie beim Protein, die CYP3A4 mRNA Expression war jedoch sowohl in der Kontrollgruppe, in der Frauen eine 1,68-fach höhere Expression zeigten, als auch im gesamten Kollektiv, in dem die mRNA Expression 1,4-fach höher waren als bei Männern, jeweils signifikant unterschiedlich. Schließlich wurde in diesem Kollektiv eine geschlechtsabhängige Differenz auch bei der CYP3A4 Enzymaktivität der mikrosomalen Fraktion bezüglich des CYP3A4 Substrates Verapamil gefunden (Wolbold et al., 2003). Die Bildungsraten der hauptsächlich durch CYP3A4 gebildeten Hauptmetaboliten D-617 und Norverapamil korrelierten jeweils gut mit der CYP3A4 Expression der jeweiligen Probe (D-617: $r_s = 0,76$; Norverapamil: $r_s = 0,75$) und die Bildung sowohl von D-617 (53,4%, $p < 0,001$) als auch von Norverapamil (49,8%, $p < 0,001$) erfolgte bei Frauen schneller als bei Männern.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene geschlechtsabhängig dimorphe CYP3A4 Expression kann die beobachteten pharmakokinetischen Unterschiede zwischen Männern und Frauen sicher einfacher, direkter und widerspruchsfreier erklären als der vorgeschlagene Mechanismus über das P-Glykoprotein. Welcher der beiden Mechanismen für die beobachteten Unterschiede, und gegebenenfalls in welchem quantitativem Ausmaß, verantwortlich ist, kann anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend bewertet werden. Möglicherweise spielen beide beobachteten Phänomene, die möglicherweise geringere Expression des P-Glykoproteins und die höhere CYP3A4 Expression bei Frauen eine Rolle und führen quasi synergistisch zu einem rascheren Metabolismus einiger CYP3A4 Substrate.

Der beobachtete Unterschied der CYP3A4 Expression wie auch der pharmakokinetischen Daten zwischen den Geschlechtern ist vor allem aus zwei Gründen besonders beachtenswert. Da Cytochrom P450 3A4 das mengenmäßig am stärksten exprimierte P450 Isoenzym der menschlichen Leber ist und insgesamt ungefähr 50% des gesamten Metabolismus aller verabreichten Medikamente bestreitet

(Wrighton et al., 1992), könnte der beobachtete geschlechtsspezifische Unterschied in vergleichsweise großer Breite pharmakokinetische Auswirkungen haben. Zum zweiten ist der Befund von besonderem Interesse weil gebärfähige Frauen bis vor wenigen Jahren aufgrund ethischer Erwägungen aus den Studien der Phase I und der frühen Phase II der Klinischen Prüfung von Arzneimitteln ausgeschlossen waren. In diesen frühen Phasen der Arzneimittelprüfung werden Wirkstoffe auf ihre Verträglichkeit geprüft, Dosierungsvorschläge für die weitere klinische Prüfung erarbeitet und erste vorläufige pharmakokinetische Parameter und pharmakodynamische Effekte ermittelt, so dass diesbezügliche Informationen speziell Frauen betreffend aus historischer Sicht für eine Reihe eingesetzter Medikamente begrenzt sind. Die *Food and Drug Administration* (FDA) in den USA entwickelte daher aus Einsicht in die Notwendigkeit diesbezüglicher Informationen 1993 neue Richtlinien für die Arzneimittelprüfung unter besonderer Berücksichtigung frauenspezifischer Themen wie Effekte des Menstruationszyklus, der Menopause, von Oestrogenen und oraler Kontrazeptiva (Merkatz et al., 1993). Da Frauen also erst seit kurzem in die frühen Phasen der Klinischen Arzneimittelprüfung miteingeschlossen sind und der beachtliche geschlechtsspezifische Expressionsunterschied des wichtigsten Cytochrom P450 Isozyms bisher nicht ausreichend erkannt worden war, ist auf die geschlechtsspezifischen Parameter von bereits eingesetzten oder sich in der Entwicklung befindlichen Arzneimitteln, welche hauptsächlich oder teilweise durch CYP3A4 metabolisiert werden, besonderes Augenmerk zu legen.

4.1.1.1 Mögliche Ursachen und potentielle Beteiligung von HNF4 α an der geschlechtsdimorphen Expression von CYP3A4

Betrachtet man den Befund, dass die Transkription des Pregnan-X-Rezeptors durch den *Hepatocyte Nuclear Factor 4 α* reguliert wird (siehe 4.2.2.1), und den Befund, dass ein Geschlechtsdimorphismus bei der Expression von CYP3A4 vorliegt, gemeinsam, ergibt sich eine interessante Perspektive.

Das Phänomen der geschlechtsdimorphen Expression von Genen ist auch beim Tier bekannt, wobei das geschlechtsspezifische Expressionsmuster von Cytochrom P450 Enzymen in der Leber vor allem in Nagern gut untersucht ist. Einige P450 Enzyme wie Cyp2D9 und Testosteron-16 α -Hydroxylase werden spezifisch von männlichen Mäusen exprimiert, andere werden verstärkt in weiblichen Mäusen exprimiert, wie z.B. Mitglieder der Cyp2B und Cyp3A Subfamilien. Auch in Ratten existieren solche Unterschiede. Ursächlich wird dies auf die geschlechtsspezifisch verschieden gepulste Wachstumshormonsekretion und die daraus resultierenden unterschiedlichen Plasmaspiegelverläufe in adulten Mäusen und Ratten zurückgeführt (Waxman et al., 1991). Bei der männlichen Ratte treten regelmäßige Pulse mit hohen Amplituden und relativ geringen Wachstumshormonspiegeln zwischen den Pulsen auf, bei den weiblichen Ratten ist der Verlauf kontinuierlicher, die Pulsamplituden sind niedriger und die Spiegel zwischen den Pulsen höher als bei den männlichen Ratten (Eden, 1979). Im Rattenhepatocytenmodell aktivieren pulsatile Wachstumshormonspiegel den *Signal Transducer and Activator of Transcription-5* (STAT5), während kontinuierliche Spiegel zu einer Verringerung des

aktivierten STAT5b, der in diesem Zelltyp dominanten STAT5 Form, führen (Gebert et al., 1997). Die Notwendigkeit und Beteiligung von STAT5b an der Aufrechterhaltung von geschlechtspezifischen Genexpressionsmustern bzw. deren Wiederherstellung durch Wachstumshormongabe nach Hypophysektomie wurde in Mäusen gezeigt (Davey et al., 1999). In Versuchen an der Ratte und mit Rattenzellkulturen wurde weiterhin gezeigt, dass die Behandlung von hypophysektomierten Ratten mit Wachstumshormon über ein regulatorisches Netzwerk (Abbildung 30) unter anderem zu einer Zunahme von HNF4 RNA führt (Lahuna et al., 2000).

Auch im Menschen sind die Plasmaspiegelverläufe des Wachstumshormons bei Männern und Frauen unterschiedlich. Neben dem Hauptsekretionsereignis beim *early slow wave sleep* verläuft die Wachstumshormonausschüttung bei beiden Geschlechtern gepulst mit einer Frequenz von ungefähr 13/Tag, wobei die Sekretion bei Frauen etwas unregelmäßiger verläuft (Pincus et al., 1996). Daneben weisen Frauen im gebärfähigen Alter schätzungsweise doppelt so hohe Wachstumshormonsekretionsraten wie Männer gleichen Alters auf (van den Berg et al., 1996), so dass der durchschnittliche Wachstumshormonspiegel aufgrund der größeren Amplituden und höheren Nadire der Hormonpulse signifikant höher ist als bei Männern (Winer et al., 1990). Aufgrund dieser physiologischen Analogien zwischen Mensch und Ratte lässt sich vermuten, dass das Wachstumshormonsekretionsmuster auch beim Menschen einen Einfluss auf die geschlechtsspezifische Expression von Genen besitzt.

Tatsächlich führt die Behandlung von humanen primären Hepatocyten mit Wachstumshormon zu einer Zunahme der CYP3A4 Expression (Liddle et al., 1998) und bei der Behandlung von wachstumshormondefizienten Probanden mit unterschiedlichen Protokollen zeigte sich, dass ein pulsatiler Behandlungsmodus zu einer Abnahme der CYP3A4 Aktivität und im Gegensatz eine kontinuierliche Wachstumshormoninfusion zu einer Zunahme der Aktivität führt (Jaffe et al., 2002). Weiterhin wurde bei Patienten mit Akromegalie eine erhöhte CYP3A4 Aktivität gefunden und die Gabe von *growth hormone releasing hormone* alle zwei Stunden über eine Woche an Männer führte zu einer Erhöhung der CYP3A4 Aktivität (Watkins et al., 1993).

Insgesamt betrachtet lässt sich aufgrund der beschriebenen Beobachtungen ein hypothetischer Signaltransduktionsweg postulieren bei dem die Genexpression des CYP3A4 in der Leber unter möglicher Beteiligung von *Hepatocyte Nuclear Factor 4 α* und dem Pregnan-X-Rezeptor unter anderem durch die Wirkung des Wachstumshormons determiniert ist (Abbildung 30). Dieser Signaltransduktionsweg könnte die geschlechtsdimorphe Expression von CYP3A4 durch die unterschiedlichen Wachstumshormonsekretionsmuster bei Männern und Frauen erklären. Einer Beteiligung des Pregnan-X-Rezeptors an diesem hypothetischen Signaltransduktionsweg widerspricht die Tatsache, dass die Analyse der PXR mRNA Expressionsdaten in den 94 Lebergewebeproben keinen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern ergab, obwohl die durchschnittliche Expression bei Frauen ungefähr 10% höher lag.

Alternativ könnte die geschlechtsdimorphe Expression auch direkt durch STAT-Proteine vermittelt werden. So wurde zum Beispiel im CYP3A10 Promotor des Hamsters ein *cis-acting* Element gefunden, das in Transaktivierungsexperimenten eine Steigerung der Aktivität durch STAT Proteine vermittelt und welches in *in vitro* DNA Bindungsexperimenten STAT5 aus Kernextrakten bindet (Subramanian et al., 1995). Eine Promotoranalyse des menschlichen CYP3A4 Gens bezüglich funktioneller STAT5 Bindungsstellen wäre aufschlussreich, um zu überprüfen, ob die in der vorliegenden Arbeit beobachtete geschlechtsdimorphe Expression des CYP3A4 auf einen direkten Effekt durch STAT-Proteine zurückzuführen ist. Eine ausschließliche Vermittlung geschlechtsspezifischer Effekte des Wachstumshormons direkt durch STAT-Proteine scheint jedoch unwahrscheinlich, da in männlichen Ratten die Wiederherstellung des geschlechtsspezifischen CYP2C11 Expressionsmusters durch Wachstumshormongabe nach Hypophysectomie ein bis zwei Tage in Anspruch nimmt, wohingegen die Aktivierung von leberspezifischem STAT5 durch Phosphorylierung innerhalb von Minuten nach Wachstumshormonbehandlung stattfindet (Waxman et al., 1995). Möglicherweise findet ein *cross talk* zwischen STAT5 und anderen Kernrezeptoren statt, wie er bereits in der Maus zwischen STAT5b und dem Oestrogenrezeptor α beobachtet wurde. Durch deren Interaktion wird die Translokation des STAT5b in den Nucleus und somit dessen regulatorische Aktivität beeinflusst (Sueyoshi et al., 1999b).

4.1.2 Variabilität der Expression des Pregnan-X-Rezeptors und Korrelation zwischen PXR und CYP3A4 Expression

Neben der bereits in einer Vielzahl anderer Arbeiten beschriebenen, ausgeprägten interindividuellen Variabilität der Expression des Cytochrom P450 3A4, welche in der vorliegenden Arbeit sowohl auf der Ebene der Proteinexpression als auch auf der der mRNA Expression bestätigt wurde, zeigte sich auch eine beträchtliche interindividuelle Variabilität der mRNA Expression des Pregnan-X-Rezeptors. Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass der *Hepatocyte Nuclear Factor 4 α* ein Regulator der Transkription von PXR ist, liegt der Gedanke nahe, dass die Variabilität unter anderem durch diesen regulatorischen Mechanismus bewirkt wird. Zum einen könnte dies durch individuell unterschiedlich starke Expression von HNF4 α oder unterschiedliche Expressionsmuster der HNF4 α Proteinisoformen 1 bis 7, welche sich in ihrem Transaktivierungspotential unterscheiden können (Drewes et al., 1996; Nakhei et al., 1998), zustande kommen. Alternativ könnte eine Modulation auch auf Ligandenebene stattfinden. Vor kurzem wurden Fettsäuren als physiologische Liganden des HNF4 α vorgeschlagen. Eine individuelle Regulation durch gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, welche ein unterschiedliches Aktivierungspotential von HNF4 α bewirken können (Hertz et al., 1998), scheint denkbar. Schließlich könnte auch das Mengenverhältnis des aktivierenden Faktors HNF4 α und inhibierender Faktoren wie zum Beispiel COUP-TFs, von denen in der vorliegenden Arbeit gezeigt

wurde, dass sie eine Repression der PXR Transkription bewirken können, eine Rolle bei der Entstehung der variablen PXR Expression spielen.

Zwischen den individuellen PXR und CYP3A4 mRNA Expressionslevels bestand sowohl im gesamten untersuchten Kollektiv aller 94 Lebergewebeproben als auch im Subkollektiv von 39 Lebergewebeproben der Kontrollgruppe ohne präoperative Medikamenteneinnahme eine signifikante Korrelation. Von einer solche Korrelation wurde auch in einer anderen Arbeit bei der Untersuchung eines kleinen Probenkollektivs berichtet (Pascussi et al., 2001).

Diese Korrelation kann vom theoretischen Standpunkt aus unter anderem durch drei naheliegende Ursachen zustande kommen. Zum einen könnte ein positiver Autoregulationsmechanismus des PXR die Ursache sein, so dass sowohl CYP3A4 als auch PXR selbst unter transkriptioneller Kontrolle des Pregnan-X-Rezeptors stehen. Für eine positive Autoregulation spricht, dass die Expression der PXR mRNA in Mäusen durch Behandlung mit dem PXR-Liganden PCN induziert werden konnte (Maglich et al., 2002). Andererseits konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Verdacht einer potentiellen Autoregulation in den durchgeführten Transfektionsexperimenten nicht erhärtet werden. Eine weitere Möglichkeit für das Zustandekommen der Korrelation ist die Tatsache, dass die Transkription sowohl von CYP3A4 als auch von PXR unter der Kontrolle eines gemeinsamen *upstream regulator*, des HNF4 α stehen. Allerdings scheint die Bedeutung von HNF4 α für die PXR Expression in der adulten Leber nicht prädominant zu sein (Hayhurst et al., 2001).

Schließlich könnte die Korrelation auch dadurch zustandekommen, dass PXR unter Beteiligung eines endogenen PXR Liganden die basale Expression des CYP3A4 reguliert und so die Menge an vorliegendem PXR direkt die CYP3A4 Expression beeinflusst. Dafür spricht, dass im Zellkulturexperiment bereits die alleinige Co-Transfektion von exogenem PXR ohne zusätzliche Behandlung mit exogenen Liganden zu einer Erhöhung der CYP3A4 Promotoraktivität führt (persönliche Mitteilung O.Burk). Aufgrund des strukturellen Aufbaus des Pregnan-X-Rezeptors kämen hier vor allem Steroidverbindungen wie Hormone oder Gallensäuren und deren Metabolite in Betracht. Falls der hypothetische endogene PXR Ligand in unterschiedlichem Ausmaß in Männern und Frauen vorhanden wäre, ergäbe sich hierbei zudem eine Erklärungsmöglichkeit für die geschlechtsabhängig unterschiedliche Expression des CYP3A4. Andererseits wäre dann zu postulieren, dass auch andere Gene, die unter der Kontrolle des Pregnan-X-Rezeptors stehen, eine gewisse geschlechtsdimorphe Expression zeigen.

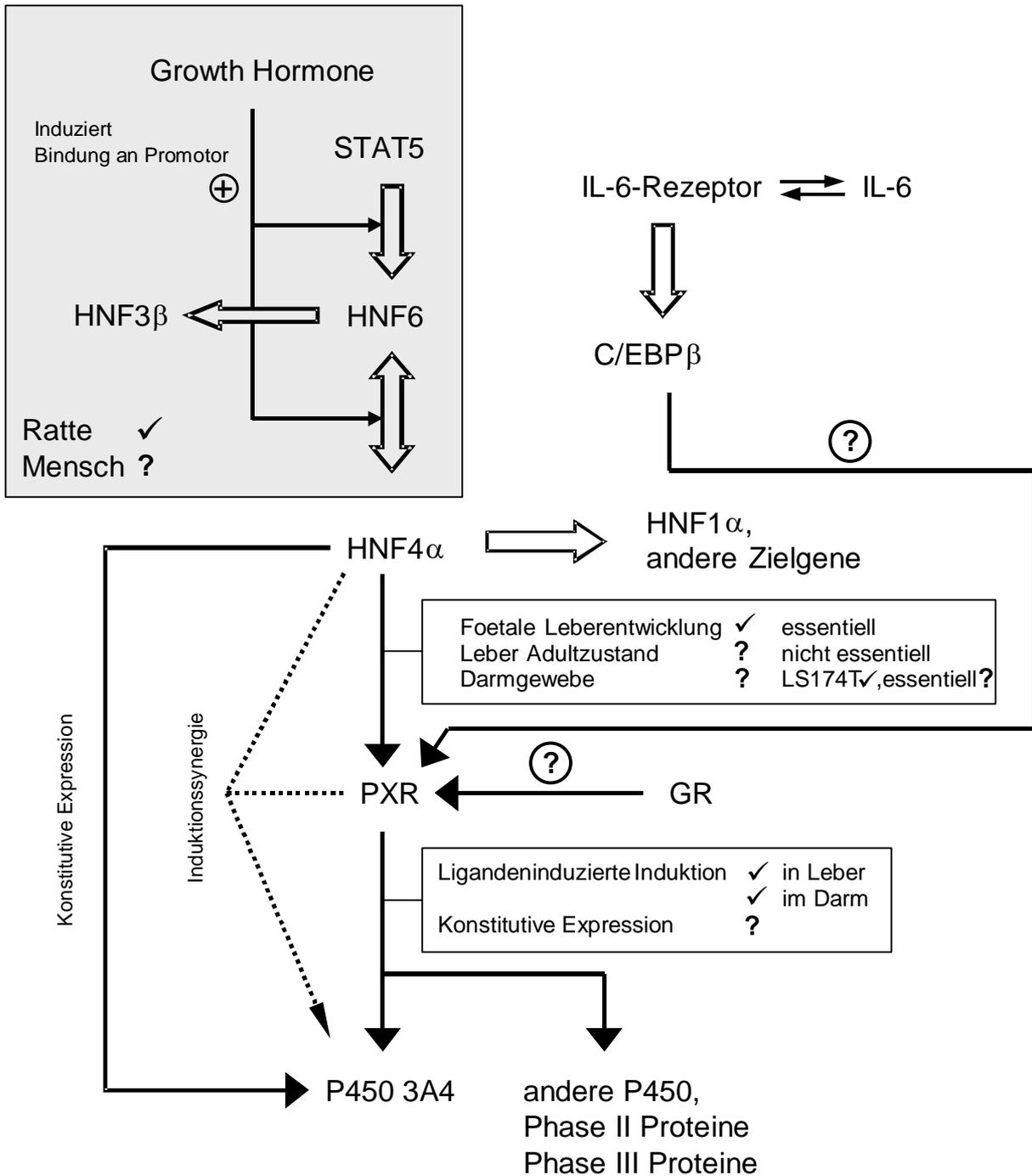


Abbildung 30. Partiiell hypothetisches Netzwerk der an der Regulation des Pregnan-X-Rezeptors, des Cytochrom P450 3A4 und des *Hepatocyte Nuclear Factor 4α* beteiligten Faktoren.

4.2 Charakterisierung des PXR-Promotors

4.2.1 Identifikation von *cis-acting* Elementen und transkriptionell relevanten Sequenzbereichen

Mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit generierten Plasmidbibliothek von unidirektionalen Verkürzungen der 5'-flankierenden Region des menschlichen PXR Gens wurde dessen Promotoraktivität in transienten Transfektionsexperimenten in verschiedenen Zelllinien untersucht, um *cis-acting* Elemente zu identifizieren, die an der transkriptionellen Regulation des PXR Gens beteiligt sind.

Anhand der Promotoraktivitätsprofile der Plasmidbibliothek in den untersuchten Zelllinien kann festgestellt werden, dass sich der PXR-Promotor in der Colonadenocarcinomzelllinie LS174T und der Hepatomzelllinie HepG2, Zelllinien, die sich von Geweben herleiten, in denen eine physiologische Expression von PXR stattfindet, qualitativ ähnlich verhielt und darüber hinaus weitgehend anders als in der Affennierenepithelzelllinie COS-1 und der Cervixcarcinomzelllinie HeLa. In der COS-1 und der HeLa Zelllinie, die beide aus Geweben abgeleitet sind in denen PXR nicht exprimiert wird, war keine ausgeprägte transkriptionelle Aktivität des Promotors zu erwarten. Dennoch lag die Aktivität des PXR Promotors deutlich über der des leeren Reporter-genvektors pGL3-Basic. Vermutlich wird diese Promotoraktivität durch ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktoren vermittelt. Ein weitgehender Verlust der Promotoraktivität trat beim Übergang vom Konstrukt pGL3-PXR(-20) zu pGL3-PXR(+26) auf. Die *in silico* Analyse dieses Bereichs zeigt, dass in der unmittelbaren Umgebung des Transkriptionsstarts mutmaßliche Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren C/EBP α , Oct-1 und NF- κ B vorliegen, die im Konstrukt pGL3-PXR(+26) nicht mehr vorhanden sind. Weiterhin war in diesen Zelllinien eine relativ geringe Aktivität der Konstrukte pGL3-PXR(-1705) bis pGL3-PXR(-805) in COS-1 bzw. pGL3-PXR(-560) in HeLa Zellen auffallend. Die Vermutung liegt nahe, dass im Sequenzbereich zwischen -2406 und -1705 Elemente mit aktivierenden Eigenschaften vorliegen und deren Wegfallen beim Konstrukt pGL3-PXR(-1705) zu einer verminderten Promotoraktivität führt und dass im Bereich zwischen -805 bzw. -560 und -479 ein oder mehrere Elemente mit inhibitorischen Eigenschaften lokalisiert sind, die durch Interaktion mit in COS-1 und HeLa Zellen vorhandenen Faktoren eine Verringerung der Aktivität bewirken (vgl. Abbildung 17). Da in den HepG2 Zellen ebenfalls zwischen -805 und -479 eine beträchtliche Zunahme der Promotoraktivität erfolgt, könnten diese mutmaßlichen Elemente auch in der HepG2 Zelllinie funktionell sein (vgl. Abbildung 16).

Auch die Promotoraktivitätsprofile in den PXR exprimierenden Zelllinien LS174T und HepG2 glichen einander weitgehend. Die stärksten Promotoraktivitäten traten in der PXR stark exprimierenden LS174T Zelllinie auf. Ein herausragendes Merkmal des Aktivitätsprofils in den LS174T Zellen war der

weitgehende Verlust der Promotoraktivität zwischen den Konstrukten pGL3-PXR(-129) und pGL3-PXR(-71). Dieser Verlust trat zwar auch in der HepG2 Zelllinie auf, dort war er aber bei weitem nicht so ausgeprägt. Dennoch verringerte sich in den HepG2 Zellen die Promotoraktivität zwischen pGL3-PXR(-191) und pGL3-PXR(-71) deutlich um ungefähr 50%. Durch ortsgerichtete Mutagenese und *in vitro* DNA Bindungsexperimente konnte ein HNF4 α -RE als *cis-acting* Element identifiziert werden, das für die Promotoraktivität in diesem Sequenzbereich verantwortlich ist (siehe 4.2.2.1). Der stufenweise Verlust der Promotoraktivität zwischen pGL3-PXR(-191) und pGL3-PXR(-71) in HepG2 Zellen scheint zwar auf eine andere Situation als in den LS174T Zellen hinzudeuten, beispielsweise die Existenz mehrerer transkriptionell aktiver Elemente zwischen Position -191 und -71. Durch die Mutation des HNF4 α -RE verringerte sich jedoch auch in der HepG2 Zelllinie die Promotoraktivität des pGL3-PXR(-191) Konstrukts auf Werte, die denen des Konstrukts pGL3-PXR(-71) entsprechen, so dass der stufenweise Verlust der Aktivität in den HepG2 Zellen auf andere Ursachen zurückzuführen sein muss. Denkbar wäre ein sequentieller Verlust HepG2-zellspezifischer Bindungsstellen für akzessorische Faktoren, die zwar die HNF4 α -vermittelte Transkription unterstützen, alleine jedoch keine transkriptionelle Aktivität hervorrufen.

Weiterhin ist den beiden Aktivitätsprofilen in LS174T und HepG2 Zellen ein Wiederanstieg der Promotoraktivität zwischen pGL3-PXR(-71) und pGL3-PXR(-20) zu eigen, was für die Existenz eines weiteren, LS174T- und HepG2-zellspezifisch funktionellen *cis-acting* Elements mit inhibitorischen Qualitäten in diesem Sequenzbereich spricht. In der vorliegenden Arbeit wurden bezüglich dieses potentiellen Elementes keine Untersuchungen durchgeführt. Zwar zeigt die *in silico* Analyse, dass in diesem Sequenzbereich potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF-1 und LyF-1 existieren. LyF-1 ist jedoch ein lymphocytenspezifischer Faktor und NF-1 ein Faktor mit aktivierenden Eigenschaften, so dass für den Wiederanstieg der Promotoraktivität keine Erklärung auf der Hand liegt. Der weitgehende Verlust der Promotoraktivität zwischen pGL3-PXR(-20) und pGL3-PXR(+26) tritt auch in LS174T und HepG2 Zellen auf, was analog zu den Verhältnissen in COS-1 und HeLa Zellen erklärt werden kann.

4.2.2 Transkriptionelle Regulation des PXR-Promotors durch *trans-acting* Faktoren

4.2.2.1 Hepatocyte Nuclear Factor 4 α

Der eindeutigste Hinweis für eine Beteiligung an der transkriptionellen Regulation des PXR Gens lag für den *Hepatocyte Nuclear Factor 4 α* vor. Die gezielte Zerstörung des HNF4 α Gens in Mäusen führt zu einem letalen embryonalen Phänotyp, da der Embryo aufgrund einer Dysfunktion des visceralen Endoderms die Gastrulation nicht vollenden kann (Chen, W. S. et al., 1994). Dieser Phänotyp konnte durch die Komplementation der HNF4 α -*knock out*-Embryos mit einem tetraploiden visceralen

Endoderm eines Wildtyp-Embryos gerettet werden (Li, J. et al., 2000). Dabei zeigte sich, dass in der Leber der geretteten HNF4 α -*knock out*-Mäusefoeten unter anderem die Transkriptionsfaktoren HNF1 α und PXR nicht mehr exprimiert werden. Eine direkte oder indirekte Beteiligung von HNF4 α an der Regulation PXR Expression schien daher wahrscheinlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass ein an Position -75 bis -87 stromaufwärts vom Transkriptionsstart des PXR Gens in der Leber lokalisiertes DR1 Motiv der Sequenz AGTCCC A AGTCCA für die Responsivität des PXR Promotors gegenüber exogenem HNF4 α 1 in Transfektionsexperimenten verantwortlich ist. Im *in vitro* DNA Bindungsexperiment bindet dieses DR1 Motiv sowohl *in vitro*-synthetisiertes HNF4 α 1 als auch HNF4 α aus Kernextrakten aus LS174T, HepG2 und Caco2 Zellen spezifisch. Das DR1 Motiv war darüber hinaus in der Lage, im Kontext des Thymidinkinaseminimalpromotors die Aktivierbarkeit dieses Promotors durch co-transfiziertes HNF4 α 1 zu erhöhen. Das DR1 Element kann aufgrund dieser Ergebnisse als HNF4 α *response element* (HNF4 α -RE) angesehen werden. Da das HNF4 α -RE eine wichtige Rolle für die basale Aktivität von PXR-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten in LS174T und HepG2 spielt (siehe 4.2.1), ist HNF4 α für einen großen Teil und im Falle der LS174T Zellen sogar für den Hauptteil der Aktivität des PXR Promotors verantwortlich.

Um die Bedeutung von HNF4 α als *upstream regulator* für die Expression von PXR *in vivo* umfassend zu verstehen sind weitere Untersuchungen notwendig. Zwar fällt die PXR Expression in der Leber von foetalen HNF4 α -*knock out*-Mäusen aus. Dagegen ist in adulten Mäusen mit einem konditionellen leberspezifischen HNF4 α -*knock out* zwar der Serumlipidspiegel und die Expression einer Reihe von am Lipidstoffwechsel und -transport beteiligten Genen verändert, die mRNA Expression vieler Kernrezeptoren aber, unter anderem die von RXR α , des Farnesoid-X-Rezeptors und des Pregnan-X-Rezeptors, blieben unverändert (Hayhurst et al., 2001). Das Genexpressionsmuster in der Leber dieser adulten, leberspezifischen HNF4 α -*knock out*-Mäuse ist abgesehen von der Expression dieser Kernrezeptoren weitgehend ähnlich wie das in den Lebern der durch *tetraploid rescue* geretteten Mäusefoeten.

Dies spricht dafür, dass HNF4 α für die Regulation der hepatischen PXR Expression vor allem während der Foetalentwicklung eine wichtige Rolle spielt und dass die hepatische Expression von PXR im adulten Tier nicht oder nicht ausschließlich durch HNF4 α reguliert wird, sondern dass weitere Transkriptionsfaktoren beteiligt sind. So bewirkt beispielsweise die Co-Transfektion von exogenem *Hepatocyte Nuclear Factor 4 γ* bei der Transfektion von COS-1 Zellen in der Tat eine Verstärkung der Aktivität von PXR-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten um einen Faktor von ungefähr 2,5 (persönliche Mitteilung O.Burk). Beim Ausfall des HNF4 α in den *knock out*-Mäusen könnten also HNF4 γ und/oder andere Faktoren kompensatorisch wirksam werden und so der Ausfall des für den Fremdstoffmetabolismus wichtigen PXR verhindert werden. Ein derartiger

Kompensationsmechanismus ist beispielsweise für die Transkriptionsfaktoren HNF1 α , HNF3 α und HNF3 γ beschrieben. *Knock out*-Mäuse für jeweils einen dieser Faktoren zeigen nur eine sehr moderate Dysregulation der hepatischen Genexpression (Pontoglio et al., 1996; Kaestner et al., 1998; Shih et al., 1999). Aufgrund des Wirkmechanismus von HNF4 α scheint eine Kompensation durch andere Faktoren gut denkbar. Der *Hepatocyte Nuclear Factor 4 α* interagiert als Kernrezeptor mit Co-Aktivatoren, die Histon-Acetylase (HAT)-Aktivität besitzen (Torchia et al., 1998). Durch die Acetylierung wird ein Chromatin-Remodelling bewirkt und durch diese Relaxation der Chromatinstruktur wird der Zugang zu regulatorischen Elementen des Promotors für weitere Transkriptionsfaktoren erleichtert, was zu einer allgemeinen Aktivierung der Transkription führen kann. Für HNF4 α wurde in der Tat gezeigt, dass eine Interaktion mit den Co-Aktivatoren SRC-1, GRIP-1 und CBP/p300 stattfindet (Wang, J. C. et al., 1998; Dell et al., 1999). Die eher unspezifische Funktion einer Chromatinrelaxation durch HNF4 α könnte in HNF4 α *knock out*-Tieren durch andere Faktoren geleistet werden.

Andererseits wäre es möglich, dass eine Art funktionelle Dichotomie vorliegt, bei der die Funktion von HNF4 α im foetalen/perinatalen Zustand während der Ausbildung des differenzierten Hepatocytenzustandes eine andere ist als im adulten Zustand, der Aufrechterhaltung des differenzierten Zustandes. Eine solche funktionelle Dichotomie in der sich entwickelnden Leber und im voll differenzierten Hepatocyten ist vor kurzem für HNF3 β beschrieben worden (Sund et al., 2000).

Gleichzeitig mit dem Abschluss des experimentellen Teils dieser Arbeit wurde eine ähnliche Funktion von HNF4 α für die Regulation des Pregnan-X-Rezeptors in der Maus beobachtet (Kamiya et al., 2003), wie die in der vorliegenden Arbeit beschriebene für PXR des Menschen. Durch Behandlung mit Oncostatin M (OSM) bzw. Matrigel, Substanzen, die eine Reifung von foetalen Hepatocyten *in vitro* bewirken, nahm die Expression des HNF4 α als einzige von einer Reihe von leberspezifischen Transkriptionsfaktoren in Primärzellkulturen von foetalen murinen Hepatocyten zu, was die prominente Rolle von HNF4 α bei der Hepatocyten-differenzierung unterstreicht. Gleichzeitig wurde beobachtet, dass es bei Behandlung mit OSM und Matrigel auch zu einer Zunahme der PXR mRNA kommt. Diese Zunahme konnte durch die Ausschaltung des HNF4 α Gens durch konditionellen *knock out* unterdrückt werden. Bei der Untersuchung der 5' flankierenden Region des PXR Gens der Maus wurde ein DR1 Motiv kurz oberhalb des PXR Transkriptionsstarts in der Maus identifiziert, dessen Sequenz zu 100% mit dem in der vorliegenden Arbeit gefundenen HNF4 α -RE übereinstimmt. Das DR1 Motiv im PXR Gen der Maus war in transienten Transfektionsexperimenten für die basale Promotoraktivität des murinen PXR Promotors in foetalen murinen Primärhepatocyten und für die Responsivität des Promotors gegenüber HNF4 α in CV-1 Zellen verantwortlich. Im *electrophoretic mobility shift assay* band das DR1 Motiv spezifisch HNF4 α aus Kernextrakten aus Mäuselebern und

verhielt sich somit in allen durchgeführten Experimenten identisch wie das in der vorliegenden Arbeit gefundene HNF4 α -RE.

Ein Vergleich der 5'-flankierenden Regionen des PXR Gens von Mensch und Maus bis jeweils 1000 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart mit dem Martinez-Needleman-Wunsch Algorithmus ergibt eine Nucleinsäuresequenzidentität von vergleichsweise geringen 31,7%. Die absolute Konservierung des für die Regulation von PXR durch HNF4 α verantwortlichen DR1 Motivs im PXR Gen des Menschen und der Maus könnte als Indiz für eine zentrale Bedeutung von HNF4 α für die transkriptionelle Regulation des Pregnan-X-Rezeptors angesehen werden.

Über die Verhältnisse in nicht hepatischen Geweben, insbesondere im Darm, dessen Bedeutung für den Fremdstoffmetabolismus zunehmend erkannt wird und in dem HNF4 α und PXR ebenfalls exprimiert werden, ist bis dato nichts bekannt. Im Darm findet aufgrund der ständigen Erneuerung der epithelialen Zellschichten eine ständige Differenzierung und Reifung der neugebildeten Enterocyten entlang der Darmvilli statt. Da HNF4 α in der Leber gerade während der Differenzierung für die Expression von PXR absolut notwendig ist, liegt die Hypothese nahe, dass HNF4 α bei der Regulation des Pregnan-X-Rezeptors in intestinalem Gewebe und vor allem in den reifenden Enterocyten eine herausragende Rolle spielt. Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente in dieser Arbeit, bei denen die Aktivität des PXR Promotors in der Adenocarcinomzelllinie LS174T fast ausschließlich vom Vorhandensein des intakten HNF4 α -RE abhing, unterstützen diese Hypothese eindrücklich. Um die Rolle von HNF4 α für die Genexpression von PXR im Darm aufzuklären, wäre die Generierung eines konditionellen *knock out* von HNF4 α im Darm von Mäusen besonders vielversprechend.

4.2.2.2 *Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factors*

In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin der Einfluss der Transkriptionsfaktoren *Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor* I und II (COUP-TF I und COUP-TF II) auf die Aktivität des PXR Promotors untersucht. COUP-TF I (EAR3, NR2F1) und COUP-TFII (ARP-1, NR2F2) sind Mitglieder der Subfamilie NR2F der Kernrezeptoren. Sie werden unter anderem in der Leber und im Darm exprimiert und spielen bei der Embryogenese eine bedeutende Rolle (Tsai et al., 1997). Es ist bekannt, dass die COUP-TFs eine reprimierende Funktion bei der Regulation der Expression einer Reihe von Genen ausüben wie zum Beispiel von Erythropoietin (Galson et al., 1995), der Apolipoproteine AII, B und CIII (Ldias et al., 1992; Mietus-Snyder et al., 1992), der Ornithintranscarbamoylase (Kimura et al., 1993), aber auch von CYP2D6 (Cairns et al., 1996), wobei die COUP-TFs oft als funktionelle Antagonisten zu HNF4 α wirken. Eine inhibierende Funktion von COUP-TFII wurde auch bei der Regulation des Kernrezeptors *Peroxisome Proliferator Activated Receptor* (PPAR α) beschrieben. Hier wurde sowohl eine Inhibition der basalen Aktivität von Promotor-Reportergen-Konstrukten des PPAR α Promotors als auch die Inhibition der HNF4 α -

vermittelten Aktivierung des Promotors durch kompetitive Bindung an das HNF4 α -RE im PPAR α -Promotors beobachtet (Pineda Torra et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Aktivität des PXR-Promotors in der Adenocarcinomzelllinie LS174T durch Co-Transfektion von Expressionsplasmiden für humanes COUP-TFI oder COUP-TFII um ungefähr 70% bzw. 50% reduziert wird und dass diese Repression durch Zerstörung des funktionellen HNF4 α -RE an Position -75 bis -87 durch ortsgerichtete Mutagenese aufgehoben werden kann. Die zunächst vermutete direkte Bindung von COUP-TFI bzw. COUP-TFII an das HNF4 α -RE konnte allerdings im *electrophoretic mobility shift assay* nicht bestätigt werden.

Eine durch COUP-TFs vermittelte transkriptionelle Repression kann auf verschiedenen Mechanismen beruhen (Cooney et al., 1993). COUP-TFs binden bevorzugt an *cis-acting* Elemente vom DR1 Typ, können aber auch DR Motive mit variabler Anzahl an *spacer*-Nucleotiden binden (Cooney et al., 1992) und sind so in der Lage, mit einer Reihe anderer, aktivierender Transkriptionsfaktoren um deren Bindungsstellen in Konkurrenz zu treten und so deren aktivierenden Einfluss teilweise oder ganz aufzuheben. Alternativ kann COUP-TFII durch Rekrutierung der Co-Repressoren NCoR (*nuclear receptor corepressor*) und SMRT (*silencing mediator of repressed transcription*) auch eine Funktion als aktiver Repressor ausüben (Shibata et al., 1997).

Bei der inhibierenden Wirkung von COUP-TFI und COUP-TFII auf die Aktivität des PXR Promotors scheint es sich weder um eine Konkurrenz mit HNF4 α 1 um dieselbe Bindungsstelle noch um einen Fall von aktiver Repression zu handeln, da weder COUP-TFI noch COUP-TFII im EMSA an das HNF4 α -RE binden, welches sowohl die Aktivierung durch HNF4 α 1 als auch die reprimierende Funktion der COUP-TFs vermittelt. Dieser zunächst paradox erscheinende Sachverhalt könnte in einer sogenannten Transrepression durch COUP-TFI und COUP-TFII begründet sein. Bei der Transrepression kommt es zu einer durch die Ligandenbindungsdomäne eines aktivierenden Faktors vermittelten Dimerisierung des aktivierenden Faktors mit einem inhibitorischen Faktor, wie zum Beispiel COUP-TF. Durch die Dimerisierung kommt es zur Verminderung oder zum Verlust des Transaktivierungspotentials des aktivierenden Faktors. Eine solche durch COUP-TF vermittelte Transrepression wurde zum Beispiel für die durch TR- (*thyroid hormone receptor*), RAR- (*retinoic acid receptor*) und RXR- (*retinoid X receptor*) vermittelte Transaktivierung beschrieben (Leng et al., 1996). Die Repression der Aktivität des PXR-Promotors *in trans* steht als einziger Mechanismus nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen der durchgeführten Experimente.

Es wird angenommen, dass das Mengenverhältnis von aktivierenden und reprimierenden Faktoren eine kritische Determinante für die transkriptionelle Aktivität eines gegebenen Promotors ist. Dies gilt ebenfalls für alle oben erwähnten Promotoren, die von dem antagonistisch wirksamen Paar HNF4 α und COUP-TF reguliert werden, und insbesondere auch für den in dieser Arbeit untersuchten PXR Promotor. Möglicherweise stellt dies eine Erklärung für die unterschiedlich starken Basalaktivitäten der PXR-Promotor-Reporter-Konstrukte in den LS174T und HepG2 Zellen dar. Obwohl in beiden

Zelllinien HNF4 α exprimiert wird (persönliche Mitteilung O.Burk) sind die basalen Promotoraktivitäten in LS174T mit ungefähr 1000-facher Aktivität im Vergleich zu pGL3-Basic deutlich höher als die in HepG2 Zellen mit ungefähr 20- bis 80-facher Aktivität verglichen mit pGL3-Basic. Eine Ursache könnte die deutlich höhere Expression des inhibitorisch wirksamen COUP-TF in der HepG2 Zelllinie darstellen (persönliche Mitteilung O.Burk).

4.2.2.3 Glucocorticoidrezeptor

Für die Beteiligung des Glucocorticoidrezeptors (GR) an der transkriptionellen Regulation des PXR Gens spricht die Tatsache, dass die Expression der PXR mRNA in primären Hepatocyten durch Behandlung mit dem Glucocorticoid Dexamethason induziert wird (Pascussi et al., 2000a), was auf einen direkten, durch den Glucocorticoidrezeptor vermittelten Effekt zurückgeführt wurde, da die gleichzeitige Behandlung mit Cycloheximid keine Veränderung der Induktion bewirkte. In einer weiteren Arbeit derselben Gruppe, bei der die Induktion von CYP3A4 durch Dexamethason untersucht wurde, konnte diese Induktion reproduziert werden. Die Behandlung von primären humanen Hepatocyten mit nanomolaren Konzentrationen von Dexamethason führte zu einer Induktion der PXR mRNA um einen Faktor von 3 bis 4 (Pascussi et al., 2001).

Im Widerspruch dazu wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Hinweise für eine Beteiligung des Glucocorticoidrezeptors an der Regulation des PXR Gens gefunden. Bei der transienten Transfektion des PXR-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukts pGL3-PXR(-2543), welches die 5'-flankierende Region des PXR-Promotors bis -2543 stromaufwärts des Transkriptionsstarts enthält, ergab sich durch die Co-Transfektion von exogenem GR α und/oder die Behandlung mit Dexamethason kein Effekt auf die Promotoraktivität. Möglicherweise befinden sich potentielle *glucocorticoid response elements* (GREs), die die Induktion der PXR Expression vermitteln, weiter stromaufwärts. Andererseits wurde bei Untersuchungen zum *cross-talk* zwischen dem GR und PXR am CYP2B6 Promotor berichtet, dass die Behandlung mit 0,1 μ M Dexamethason im Gegensatz zu den oben erwähnten Befunden nicht zu einer Veränderung der PXR mRNA Expression führte (Wang, H. et al., 2003). Um die Beteiligung des GR an der Regulation der Expression von PXR abschließend zu klären sind weitere Untersuchungen notwendig. Ein möglicher Ansatz wäre die Erweiterung des vor das Reporter-Gen subklonierten Bereichs der 5' flankierenden Region des PXR Gens und die anschließende Untersuchung von unidirektionalen Deletionen des erweiterten Bereichs durch transiente Transfektionsexperimente.

4.2.2.4 Autoregulation des Pregnan-X-Rezeptors

Ein Indiz dafür, dass der Pregnan-X-Rezeptor seine eigene Expression im Sinne einer Autoregulation beeinflusst, ergab sich aus einer Untersuchung zur Induktion von Proteinen der Phasen I, II und III sowie an deren Regulation beteiligten Kernrezeptoren durch PCN in der Leber von Mäusen. Dort wurde durch die Behandlung mit dem PXR Liganden PCN die PXR mRNA Expression um einen

Faktor von 2,7 induziert (Maglich et al., 2002). Desweiteren lag der Gedanke nahe, dass die in der vorliegenden Arbeit gefundene Korrelation zwischen der mRNA des Pregnan-X-Rezeptors und von CYP3A4 (N=94; $r=0,70$; $p<0,0001$ bzw. N=39; $r=0,82$; $p<0,0001$), die auch in einer anderen Arbeit an einem sehr viel kleineren Kollektiv bestätigt worden war (N=10; $r^2=0,68$; $p=0,025$) (Pascussi et al., 2001), vom theoretischen Standpunkt betrachtet unter anderem dadurch zustande kommen könnte, dass PXR neben seiner regulatorischen Funktion bezüglich CYP3A4 gleichzeitig seine eigene Expression reguliert. Es wurden jedoch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Transfektionsexperimenten keine Anhaltspunkte für PXR Bindungsstellen innerhalb der untersuchten 5' flankierenden Region des PXR Gens und somit für eine Autoregulation von PXR gefunden. Es ist denkbar, dass eine positive Autoregulation von PXR im verwendeten experimentellen System, d.h. der Untersuchung der Promotoraktivität in LS174T Colonadenocarcinomzellen, nicht detektierbar ist, da das als Positivkontrolle eingesetzte Konstrukt zwar eine deutliche Induktion der Promotoraktivität durch Co-Transfektion von PXR und/oder Behandlung mit 10 μ M Rifampicin zeigte, das untersuchte PXR-Promotor-Reporter-gen-Konstrukt pGL3-PXR(-2543) jedoch bereits von vorneherein ein sehr starke Promotoraktivität in den LS174T Zellen zeigte. Es könnte also möglicherweise eine Art Sättigung von aktivierenden Transkriptionsfaktoren am Promotor vorliegen, so dass durch eine weitere Stimulierung durch Rifampicinbehandlung bzw. Co-Transfektion von exogenem PXR keine weitere Steigerung der Promotoraktivität erreichbar wäre. Andererseits sprechen auch die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss von Rifampicin auf die Expression von CYP3A4, MDR1 und PXR im Duodenum gegen eine Autoregulation in intestinalem Gewebe, da die mRNA Expression von PXR bei allen sieben untersuchten Probanden durch die Einnahme von Rifampicin praktisch unbeeinflusst blieb. Da die Induktion der PXR mRNA durch PCN in der Leber beobachtet wurde, könnte es sich auch um einen gewebespezifischen Effekt handeln. Hiergegen spricht jedoch, dass auch beim Experiment in der humanen Hepatomzelllinie HepG2 die Co-Transfektion von exogenem PXR und/oder die Behandlung mit Rifampicin keine Verstärkung der PXR-Promotoraktivität bewirkte (persönliche Mitteilung O. Burk). Eine negative Autoregulation von PXR im Sinne einer Feedback-Hemmung ist anhand der vorliegenden Daten jedoch auszuschließen. Analog zu den Befunden für den Glucocorticoidrezeptor wäre auch hier weiterführend eine Erweiterung des subklonierten PXR-Promotorbereiches sinnvoll, um mögliche PXR-Bindungsstellen, die stromaufwärts vom bisher untersuchten Bereich liegen, erfassen zu können.

4.2.2.5 CCAAT Enhancer Binding Protein β

Als weiterer potentiell an der transkriptionellen Regulation des Pregnan-X-Rezeptors beteiligter Faktor könnte das CCAAT *enhancer binding protein* β (C/EBP β) von besonderem Interesse sein. In Experimenten mit primären menschlichen Hepatocyten zeigte sich, dass die Behandlung mit Interleukin-6 (IL-6) zu einer schnellen und beträchtlichen Reduktion der mRNAs von CAR und PXR führte und zum anderen die Induktion von CYP3A4 durch Rifampicin vermindert wurde

(Pascussi et al., 2000b). In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass eine Verringerung der CYP3A4 Expression in menschlichen Hepatomzellen durch IL-6 durch den Transkriptionsfaktor C/EBP β vermittelt wird (Jover et al., 2002). Durch die Behandlung mit IL-6 wurde eine mäßige Zunahme der C/EBP β mRNA insgesamt erzeugt und eine massive Zunahme der Proteinisoform C/EBP β -LIP (*liver-enriched transcriptional inhibitory protein*) gefunden. Die beiden Isoformen C/EBP β -LIP und C/EBP β -LAP (*liver enriched transcriptional activating protein*) entstehen durch Translation derselben mRNA, C/EBP β -LIP besitzt zwar die DNA-Bindungsdomäne und die Dimerisierungsdomäne, jedoch fehlt der größte Teil der Transaktivierungsdomäne. C/EBP β -LIP wirkt daher im Gegensatz zur Isoform C/EBP β -LAP repressorisch auf die CYP3A4 Expression, wobei davon ausgegangen wird, dass es sich um ein Wettbewerbsphänomen zwischen C/EBP β -LIP und der aktivierenden Isoform C/EBP β -LAP bzw. auch C/EBP α handelt.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit generierten Bibliothek von PXR-Promotor-Reporter-gen-Konstrukten ließe sich die Wirkung von Interleukin-6 und der C/EBP β Proteinisoformen sowie deren potentiell antagonistischer Effekt auf die Promotoraktivität des PXR-Promotors untersuchen und so eine direkte Beteiligung von C/EBP β an der Regulation der PXR Expression überprüfen. Ein regulatorischer Effekt von C/EBP β auf die Transkription von PXR scheint besonders deswegen naheliegend, weil bei einem Vergleich der 5'-flankierenden Regionen des PXR Gens des Menschen und der Maus mit dem *Clustal* Algorithmus ungefähr 30 bp stromaufwärts vom in dieser Arbeit identifizierten HNF4 α *response element* ein Sequenzbereich von 14 bp Länge zu erkennen ist, der wie das HNF4 α -RE zu 100% konserviert ist. Eine *in silico* Analyse dieses Bereichs mittels der TRANSFAC Datenbank ergibt, dass innerhalb der konservierten Sequenz eine mutmaßliche C/EBP β Bindungsstelle vorliegt, die sich vom C/EBP β Konsensusbindungsmotiv 5'-TKNNGNAAK-3' nur in einem Nucleotidrest unterscheidet.

Falls sich C/EBP β tatsächlich als ein Regulator der PXR Expression herausstellen sollte, könnte dies ein Teil der Erklärung dafür sein, weshalb der hepatische Fremdstoffmetabolismus während Infektions- und Entzündungsereignissen durch verminderte Expression von Cytochrom P450 Enzymen im Menschen und im Tier *in vivo* herabgesetzt ist (Morgan, 1993; Morgan et al., 1994). Durch die Wirkung des Inflammationsmediators IL-6 ergäbe sich eine Verschiebung im Gleichgewicht der C/EBP β Proteinisoformen und durch die nachfolgend verringerte PXR Expression ergäbe sich möglicherweise ein schlechteres Ansprechen der mittels PXR induzierten P450 Enzyme auf Belastung mit Xenobiotika oder eine geringere, möglicherweise durch PXR vermittelte basale Expression (Abbildung 30).

4.3 Bedeutung von HNF4 α für die Biotransformation

Die Bedeutung des Pregnan-X-Rezeptors für die Regulation des Fremdstoffmetabolismus insgesamt und des Cytochrom P450 3A4 im speziellen steht mittlerweile außer Frage. Darüber hinaus deuten neuere Befunde daraufhin, dass der *Hepatocyte Nuclear Factor 4 α* eine bedeutendere Rolle für die Biotransformation und das CYP3A4 spielt, als bisher angenommen.

Vor kurzem wurde beobachtet, dass ein im proximalen Promotor gelegenes Bindungselement vom DR1 Typ eine Transaktivierung des Promotors des CYP3A4 Gens durch HNF4 α in LS174T Zellen vermittelt (Tegude, 2003). Außerdem ist bekannt, dass der *Hepatocyte Nuclear Factor 4 α* die Responsivität des CYP3A4 Promotors gegenüber einer Transaktivierung durch den Pregnan-X-Rezeptor und den *Constitutive Androstane Receptor* moduliert (Tirona et al., 2003). Dieser Effekt wird durch ein HNF4 α -RE an Position -7783 bis -7771 im distalen *Xenobiotic Response Enhancer Module* (XREM) des CYP3A4 Promotors vermittelt.

Betrachtet man diese Befunde gemeinsam mit der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Regulation des Pregnan-X-Rezeptors durch HNF4 α , so ergibt sich ein regulatorisches Mikronetzwerk für das Cytochrom P450 3A4 und eine bisher nicht erkannte Schlüsselrolle für den *Hepatocyte Nuclear Factor 4 α* im Biotransformationssystem. Die Expression eines der wichtigsten fremdstoffmetabolisierenden Enzyme wird durch HNF4 α sowohl direkt aber auch indirekt über den Pregnan-X-Rezeptor kontrolliert, welcher eine ligandenabhängige Induktion des CYP3A4 vermittelt, möglicherweise aber auch durch einen bisher nicht identifizierten endogenen Liganden die basale Transkription von CYP3A4 reguliert (Abbildung 30). Dieses Regulationsnetzwerk könnte gleichzeitig eine Erklärung für die gute Korrelation der PXR und CYP3A4 mRNA Expression darstellen [Wolbold, 2003 #406; Pascussi, 2001 #61], da sowohl die Transkription von PXR als auch die von CYP3A4 unter der Kontrolle von HNF4 α steht.

Die Gruppe der Gene, die zumindest teilweise unter der regulatorischen Kontrolle von HNF4 α stehen, scheint sich damit auf die Gene der Biotransformation auszuweiten. Neben CYP3A4 ist der Einfluß auf das CYP2D6 seit langem bekannt (Cairns et al., 1996) und eine weitere Zunahme der Bedeutung von HNF4 α für den Xenobiotikastoffwechsel scheint möglich und wahrscheinlich, z.B. innerhalb der momentan unter intensiver Forschung stehenden Gruppe der Transporterproteine.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Ameer, B. und Weintraub, R. A. (1997). "Drug interactions with grapefruit juice." Clin Pharmacokinet **33**(2): 103-21.
- Aoyama, T., Yamano, S., Guzelian, P. S., Gelboin, H. V. und Gonzalez, F. J. (1990). "Five of 12 forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P450 metabolically activate aflatoxin B1." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(12): 4790-3.
- Araya, Z. und Wikvall, K. (1999). " α -hydroxylation of taurochenodeoxycholic acid and lithocholic acid by CYP3A4 in human liver microsomes." Biochim Biophys Acta **1438**(1): 47-54.
- Austin, K. L., Mather, L. E., Philpot, C. R. und McDonald, P. J. (1980). "Intersubject and dose-related variability after intravenous administration of erythromycin." Br J Clin Pharmacol **10**(3): 273-9.
- Beato, M., Herrlich, P. und Schutz, G. (1995). "Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot." Cell **83**(6): 851-7.
- Beierle, I., Meibohm, B. und Derendorf, H. (1999). "Gender differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics." Int J Clin Pharmacol Ther **37**(11): 529-47.
- Bertilsson, G., Heidrich, J., Svensson, K., Asman, M., Jendeberg, L., Sydow-Backman, M., et al. (1998). "Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12208-13.
- Bertz, R. J. und Granneman, G. R. (1997). "Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions." Clin Pharmacokinet **32**(3): 210-58.
- Blumberg, B., Sabbagh, W., Jr., Juguilon, H., Bolado, J., Jr., van Meter, C. M., Ong, E. S., et al. (1998). "SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor." Genes Dev **12**(20): 3195-205.
- Bock, K. W., Schrenk, D., Forster, A., Griese, E. U., Morike, K., Brockmeier, D., et al. (1994). "The influence of environmental and genetic factors on CYP2D6, CYP1A2 and UDP-glucuronosyltransferases in man using sparteine, caffeine, and paracetamol as probes." Pharmacogenetics **4**(4): 209-18.
- Breidenbach, T., Hoffmann, M. W., Becker, T., Schlitt, H. und Klempnauer, J. (2000). "Drug interaction of St John's wort with cyclosporin." Lancet **355**(9218): 1912.
- Buters, J. T., Korzekwa, K. R., Kunze, K. L., Omata, Y., Hardwick, J. P. und Gonzalez, F. J. (1994). "cDNA-directed expression of human cytochrome P450 CYP3A4 using baculovirus." Drug Metab Dispos **22**(5): 688-92.
- Cairns, W., Smith, C. A., McLaren, A. W. und Wolf, C. R. (1996). "Characterization of the human cytochrome P4502D6 promoter. A potential role for antagonistic interactions between members of the nuclear receptor family." J Biol Chem **271**(41): 25269-76.
- Chen, H., Lin, R. J., Xie, W., Wilpitz, D. und Evans, R. M. (1999). "Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase." Cell **98**(5): 675-86.
- Chen, W. S., Manova, K., Weinstein, D. C., Duncan, S. A., Plump, A. S., Prezioso, V. R., et al. (1994). "Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos." Genes Dev **8**(20): 2466-77.
- Choi, K. H., Chen, C. J., Kriegler, M. und Roninson, I. B. (1988). "An altered pattern of cross-resistance in multidrug-resistant human cells results from spontaneous mutations in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene." Cell **53**(4): 519-29.

- Coffinier, C., Thepot, D., Babinet, C., Yaniv, M. und Barra, J. (1999). "Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation." *Development* **126**(21): 4785-94.
- Combalbert, J., Fabre, I., Fabre, G., Dalet, I., Derancourt, J., Cano, J. P., et al. (1989). "Metabolism of cyclosporin A. IV. Purification and identification of the rifampicin-inducible human liver cytochrome P-450 (cyclosporin A oxidase) as a product of P450III A gene subfamily." *Drug Metab Dispos* **17**(2): 197-207.
- Cooney, A. J., Leng, X., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W. und Tsai, M. J. (1993). "Multiple mechanisms of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-dependent repression of transactivation by the vitamin D, thyroid hormone, and retinoic acid receptors." *J Biol Chem* **268**(6): 4152-60.
- Cooney, A. J., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W. und Tsai, M. J. (1992). "Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) dimers bind to different GGTC A response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D3, thyroid hormone, and retinoic acid receptors." *Mol Cell Biol* **12**(9): 4153-63.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J. P., Boccia, J., Casals, D., Bertino, J. R. und Melamed, M. R. (1990). "Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues." *J Histochem Cytochem* **38**(9): 1277-87.
- Courtois, A., Payen, L., Guillouzo, A. und Fardel, O. (1999). "Up-regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) expression in rat hepatocytes by dexamethasone." *FEBS Lett* **459**(3): 381-5.
- Cummins, C. L., Wu, C. Y. und Benet, L. Z. (2002). "Sex-related differences in the clearance of cytochrome P450 3A4 substrates may be caused by P-glycoprotein." *Clin Pharmacol Ther* **72**(5): 474-89.
- Dai, D., Tang, J., Rose, R., Hodgson, E., Bienstock, R. J., Mohrenweiser, H. W., et al. (2001). "Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos." *J Pharmacol Exp Ther* **299**(3): 825-31.
- Darimont, B. D., Wagner, R. L., Apriletti, J. W., Stallcup, M. R., Kushner, P. J., Baxter, J. D., et al. (1998). "Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions." *Genes Dev* **12**(21): 3343-56.
- Davey, H. W., Wilkins, R. J. und Waxman, D. J. (1999). "STAT5 signaling in sexually dimorphic gene expression and growth patterns." *Am J Hum Genet* **65**(4): 959-65.
- Del Sal, G., Manfioletti, G. und Schneider, C. (1988). "A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing." *Nucleic Acids Res* **16**(20): 9878.
- Dell, H. und Hadzopoulou-Cladaras, M. (1999). "CREB-binding protein is a transcriptional coactivator for hepatocyte nuclear factor-4 and enhances apolipoprotein gene expression." *J Biol Chem* **274**(13): 9013-21.
- Desai, P. B., Nallani, S. C., Sane, R. S., Moore, L. B., Goodwin, B. J., Buckley, D. J., et al. (2002). "Induction of cytochrome P450 3A4 in primary human hepatocytes and activation of the human pregnane X receptor by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen." *Drug Metab Dispos* **30**(5): 608-12.
- Dilger, K., Eckhardt, K., Hofmann, U., Kucher, K., Mikus, G. und Eichelbaum, M. (1999). "Chronopharmacology of intravenous and oral modified release verapamil." *Br J Clin Pharmacol* **47**(4): 413-9.
- Dotzlaw, H., Leygue, E., Watson, P. und Murphy, L. C. (1999). "The human orphan receptor PXR messenger RNA is expressed in both normal and neoplastic breast tissue." *Clin Cancer Res* **5**(8): 2103-7.

- Drewes, T., Senkel, S., Holewa, B. und Ryffel, G. U. (1996). "Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes." *Mol Cell Biol* **16**(3): 925-31.
- Drocourt, L., Pascussi, J. M., Assenat, E., Fabre, J. M., Maurel, P. und Vilarem, M. J. (2001). "Calcium channel modulators of the dihydropyridine family are human pregnane X receptor activators and inducers of CYP3A, CYP2B, and CYP2C in human hepatocytes." *Drug Metab Dispos* **29**(10): 1325-31.
- Duncan, S. A., Navas, M. A., Dufort, D., Rossant, J. und Stoffel, M. (1998). "Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism." *Science* **281**(5377): 692-5.
- Dunn, R. T., 2nd, Gleason, B. A., Hartley, D. P. und Klaassen, C. D. (1999). "Postnatal ontogeny and hormonal regulation of sulfotransferase SULT1B1 in male and female rats." *J Pharmacol Exp Ther* **290**(1): 319-24.
- Durr, D., Stieger, B., Kullak-Ublick, G. A., Rentsch, K. M., Steinert, H. C., Meier, P. J., et al. (2000). "St John's Wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4." *Clin Pharmacol Ther* **68**(6): 598-604.
- Dussault, I., Lin, M., Hollister, K., Wang, E. H., Synold, T. W. und Forman, B. M. (2001). "Peptide mimetic HIV protease inhibitors are ligands for the orphan receptor SXR." *J Biol Chem* **276**(36): 33309-12.
- Eden, S. (1979). "Age- and sex-related differences in episodic growth hormone secretion in the rat." *Endocrinology* **105**(2): 555-60.
- Einarsson, K. und Gustafsson, J. A. (1973). "Effects of a potent catatoxic steroid, 16 -cyanopregnenolone, on microsomal metabolism of steroid hormones, sterols and bile acids in rats." *Eur J Biochem* **32**(2): 197-206.
- Eliasson, E., Mkrtchian, S., Halpert, J. R. und Ingelman-Sundberg, M. (1994). "Substrate-regulated, cAMP-dependent phosphorylation, denaturation, and degradation of glucocorticoid-inducible rat liver cytochrome P450 3A1." *J Biol Chem* **269**(28): 18378-83.
- Ernst, E. (1999). "Second thoughts about safety of St John's wort." *Lancet* **354**(9195): 2014-6.
- Ernst, E., Rand, J. I., Barnes, J. und Stevinson, C. (1998). "Adverse effects profile of the herbal antidepressant St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.)." *Eur J Clin Pharmacol* **54**(8): 589-94.
- Escriva, H., Delaunay, F. und Laudet, V. (2000). "Ligand binding and nuclear receptor evolution." *Bioessays* **22**(8): 717-27.
- Escriva, H., Safi, R., Hanni, C., Langlois, M. C., Saumitou-Laprade, P., Stehelin, D., et al. (1997). "Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(13): 6803-8.
- Falkner, K. C., Pinaire, J. A., Xiao, G. H., Geoghegan, T. E. und Prough, R. A. (2001). "Regulation of the rat glutathione S-transferase A2 gene by glucocorticoids: involvement of both the glucocorticoid and pregnane X receptors." *Mol Pharmacol* **60**(3): 611-9.
- Felix, C. A., Walker, A. H., Lange, B. J., Williams, T. M., Winick, N. J., Cheung, N. K., et al. (1998). "Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(22): 13176-81.
- Fromm, M. F., Kauffmann, H. M., Fritz, P., Burk, O., Kroemer, H. K., Warzok, R. W., et al. (2000). "The effect of rifampin treatment on intestinal expression of human MRP transporters." *Am J Pathol* **157**(5): 1575-80.
- Galson, D. L., Tsuchiya, T., Tendler, D. S., Huang, L. E., Ren, Y., Ogura, T., et al. (1995). "The orphan receptor hepatic nuclear factor 4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific

- erythropoietin gene expression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1." *Mol Cell Biol* **15**(4): 2135-44.
- Gampe, R. T., Jr., Montana, V. G., Lambert, M. H., Miller, A. B., Bledsoe, R. K., Milburn, M. V., et al. (2000). "Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors." *Mol Cell* **5**(3): 545-55.
- Gebert, C. A., Park, S. H. und Waxman, D. J. (1997). "Regulation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 5b activation by the temporal pattern of growth hormone stimulation." *Mol Endocrinol* **11**(4): 400-14.
- Ged, C., Rouillon, J. M., Pichard, L., Combalbert, J., Bressot, N., Bories, P., et al. (1989). "The increase in urinary excretion of 6 beta-hydroxycortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450IIIa induction." *Br J Clin Pharmacol* **28**(4): 373-87.
- Geick, A., Eichelbaum, M. und Burk, O. (2001). "Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin." *J Biol Chem* **276**(18): 14581-7.
- George, J., Byth, K. und Farrell, G. C. (1995). "Age but not gender selectively affects expression of individual cytochrome P450 proteins in human liver." *Biochem Pharmacol* **50**(5): 727-30.
- Gerbal-Chaloin, S., Daujat, M., Pascussi, J. M., Pichard-Garcia, L., Vilarem, M. J. und Maurel, P. (2002). "Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor." *J Biol Chem* **277**(1): 209-17.
- Gerbal-Chaloin, S., Pascussi, J. M., Pichard-Garcia, L., Daujat, M., Waechter, F., Fabre, J. M., et al. (2001). "Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture." *Drug Metab Dispos* **29**(3): 242-51.
- Giguere, V. (1999). "Orphan nuclear receptors: from gene to function." *Endocr Rev* **20**(5): 689-725.
- Giguere, V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R. M. und Otulakowski, G. (1994). "Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors." *Genes Dev* **8**(5): 538-53.
- Goodwin, B., Hodgson, E. und Liddle, C. (1999). "The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module." *Mol Pharmacol* **56**(6): 1329-39.
- Goodwin, B., Moore, L. B., Stoltz, C. M., McKee, D. D. und Kliewer, S. A. (2001). "Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor." *Mol Pharmacol* **60**(3): 427-31.
- Green, S. und Chambon, P. (1987). "Oestradiol induction of a glucocorticoid-responsive gene by a chimaeric receptor." *Nature* **325**(6099): 75-8.
- Green, S. und Chambon, P. (1988). "Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation." *Trends Genet* **4**(11): 309-14.
- Greenblatt, D. J., Allen, M. D., Harmatz, J. S. und Shader, R. I. (1980). "Diazepam disposition determinants." *Clin Pharmacol Ther* **27**(3): 301-12.
- Greiner, B., Eichelbaum, M., Fritz, P., Kreichgauer, H. P., von Richter, O., Zundler, J., et al. (1999). "The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin." *J Clin Invest* **104**(2): 147-53.
- Guengerich, F. P. (1999). "Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 1-17.

- Guengerich, F. P. und Turvy, C. G. (1991). "Comparison of levels of several human microsomal cytochrome P-450 enzymes and epoxide hydrolase in normal and disease states using immunochemical analysis of surgical liver samples." *J Pharmacol Exp Ther* **256**(3): 1189-94.
- Hadzopoulou-Cladaras, M., Kistanova, E., Evagelopoulou, C., Zeng, S., Cladaras, C. und Ladas, J. A. (1997). "Functional domains of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4." *J Biol Chem* **272**(1): 539-50.
- Hagg, S., Spigset, O. und Dahlqvist, R. (2001). "Influence of gender and oral contraceptives on CYP2D6 and CYP2C19 activity in healthy volunteers." *Br J Clin Pharmacol* **51**(2): 169-73.
- Handschin, C., Podvinec, M. und Meyer, U. A. (2000). "CXR, a chicken xenobiotic-sensing orphan nuclear receptor, is related to both mammalian pregnane X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(20): 10769-74.
- Harding, H. P. und Lazar, M. A. (1993). "The orphan receptor Rev-Erba alpha activates transcription via a novel response element." *Mol Cell Biol* **13**(5): 3113-21.
- Harris, R. Z., Benet, L. Z. und Schwartz, J. B. (1995). "Gender effects in pharmacokinetics and pharmacodynamics." *Drugs* **50**(2): 222-39.
- Hayhurst, G. P., Lee, Y. H., Lambert, G., Ward, J. M. und Gonzalez, F. J. (2001). "Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis." *Mol Cell Biol* **21**(4): 1393-403.
- Hecht, S. S. (1999). "DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines." *Mutat Res* **424**(1-2): 127-42.
- Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S. und Parker, M. G. (1997). "A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors." *Nature* **387**(6634): 733-6.
- Hertz, R., Magenheimer, J., Berman, I. und Bar-Tana, J. (1998). "Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha." *Nature* **392**(6675): 512-6.
- Hosokawa, M., Hattori, K. und Satoh, T. (1993). "Differential responses of rat hepatic microsomal carboxylesterase isozymes to glucocorticoids and pregnenolone 16 alpha-carbonitrile." *Biochem Pharmacol* **45**(11): 2317-22.
- Hu, X. und Lazar, M. A. (1999). "The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors." *Nature* **402**(6757): 93-6.
- Huang, N., vom Baur, E., Garnier, J. M., Lerouge, T., Vonesch, J. L., Lutz, Y., et al. (1998). "Two distinct nuclear receptor interaction domains in NSD1, a novel SET protein that exhibits characteristics of both corepressors and coactivators." *Embo J* **17**(12): 3398-412.
- Hulst, L. K., Fleishaker, J. C., Peters, G. R., Harry, J. D., Wright, D. M. und Ward, P. (1994). "Effect of age and gender on tirilazad pharmacokinetics in humans." *Clin Pharmacol Ther* **55**(4): 378-84.
- Hunt, C. M., Westerkam, W. R. und Stave, G. M. (1992). "Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A." *Biochem Pharmacol* **44**(2): 275-83.
- Hustert, E., Haberl, M., Burk, O., Wolbold, R., He, Y. Q., Klein, K., et al. (2001a). "The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism." *Pharmacogenetics* **11**(9): 773-9.
- Hustert, E., Zibat, A., Presecan-Siedel, E., Eiselt, R., Mueller, R., Fuss, C., et al. (2001b). "Natural protein variants of pregnane X receptor with altered transactivation activity toward CYP3A4." *Drug Metab Dispos* **29**(11): 1454-9.

- Inagaki, K., Inagaki, M., Kataoka, T., Sekido, I., Gill, M. A. und Nishida, M. (2002). "A wide interindividual variability of urinary 6beta-hydroxycortisol to free cortisol in 487 healthy Japanese subjects in near Basal condition." *Ther Drug Monit* **24**(6): 722-7.
- Iyemere, V. P., Davies, N. H. und Brownlee, G. G. (1998). "The activation function 2 domain of hepatic nuclear factor 4 is regulated by a short C-terminal proline-rich repressor domain." *Nucleic Acids Res* **26**(9): 2098-104.
- Jaffe, C. A., Turgeon, D. K., Lown, K., Demott-Friberg, R. und Watkins, P. B. (2002). "Growth hormone secretion pattern is an independent regulator of growth hormone actions in humans." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**(5): E1008-15.
- Jiang, G., Nepomuceno, L., Hopkins, K. und Sladek, F. M. (1995). "Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors." *Mol Cell Biol* **15**(9): 5131-43.
- Johne, A., Brockmoller, J., Bauer, S., Maurer, A., Langheinrich, M. und Roots, I. (1999). "Pharmacokinetic interaction of digoxin with an herbal extract from St John's wort (*Hypericum perforatum*)." *Clin Pharmacol Ther* **66**(4): 338-45.
- Jones, S. A., Moore, L. B., Shenk, J. L., Wisely, G. B., Hamilton, G. A., McKee, D. D., et al. (2000). "The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution." *Mol Endocrinol* **14**(1): 27-39.
- Jover, R., Bort, R., Gomez-Lechon, M. J. und Castell, J. V. (2002). "Down-regulation of human CYP3A4 by the inflammatory signal interleukin-6: molecular mechanism and transcription factors involved." *Faseb J* **16**(13): 1799-801.
- Juliano, R. L. und Ling, V. (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." *Biochim Biophys Acta* **455**(1): 152-62.
- Kaestner, K. H., Hiemisch, H. und Schutz, G. (1998). "Targeted disruption of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 3gamma results in reduced transcription of hepatocyte-specific genes." *Mol Cell Biol* **18**(7): 4245-51.
- Kahan, B. D., Kramer, W. G., Wideman, C., Flechner, S. M., Lorber, M. I. und Van Buren, C. T. (1986). "Demographic factors affecting the pharmacokinetics of cyclosporine estimated by radioimmunoassay." *Transplantation* **41**(4): 459-64.
- Kamiya, A., Inoue, Y. und Gonzalez, F. J. (2003). "Role of the hepatocyte nuclear factor 4alpha in control of the pregnane X receptor during fetal liver development." *Hepatology* **37**(6): 1375-84.
- Kast, H. R., Goodwin, B., Tarr, P. T., Jones, S. A., Anisfeld, A. M., Stoltz, C. M., et al. (2002). "Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor." *J Biol Chem* **277**(4): 2908-15.
- Kastner, P., Mark, M. und Chambon, P. (1995). "Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life?" *Cell* **83**(6): 859-69.
- Kato, S., Tora, L., Yamauchi, J., Masushige, S., Bellard, M. und Chambon, P. (1992). "A far upstream estrogen response element of the ovalbumin gene contains several half-palindromic 5'-TGACC-3' motifs acting synergistically." *Cell* **68**(4): 731-42.
- Kimura, A., Nishiyori, A., Murakami, T., Tsukamoto, T., Hata, S., Osumi, T., et al. (1993). "Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) represses transcription from the promoter of the

- gene for ornithine transcarbamylase in a manner antagonistic to hepatocyte nuclear factor-4 (HNF-4)." *J Biol Chem* **268**(15): 11125-33.
- Kliwer, S. A., Lehmann, J. M. und Willson, T. M. (1999). "Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse." *Science* **284**(5415): 757-60.
- Kliwer, S. A., Moore, J. T., Wade, L., Staudinger, J. L., Watson, M. A., Jones, S. A., et al. (1998). "An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway." *Cell* **92**(1): 73-82.
- Kocarek, T. A., Schuetz, E. G., Strom, S. C., Fisher, R. A. und Guzelian, P. S. (1995). "Comparative analysis of cytochrome P4503A induction in primary cultures of rat, rabbit, and human hepatocytes." *Drug Metab Dispos* **23**(3): 415-21.
- Kolars, J. C., Schmiedlin-Ren, P., Schuetz, J. D., Fang, C. und Watkins, P. B. (1992). "Identification of rifampin-inducible P450III_{A4} (CYP3A₄) in human small bowel enterocytes." *J Clin Invest* **90**(5): 1871-8.
- Krecic-Shepard, M. E., Park, K., Barnas, C., Slimko, J., Kerwin, D. R. und Schwartz, J. B. (2000). "Race and sex influence clearance of nifedipine: results of a population study." *Clin Pharmacol Ther* **68**(2): 130-42.
- Ktistaki, E., Ktistakis, N. T., Papadogeorgaki, E. und Talianidis, I. (1995). "Recruitment of hepatocyte nuclear factor 4 into specific intranuclear compartments depends on tyrosine phosphorylation that affects its DNA-binding and transactivation potential." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(21): 9876-80.
- Kuehl, P., Zhang, J., Lin, Y., Lamba, J., Assem, M., Schuetz, J., et al. (2001). "Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression." *Nat Genet* **27**(4): 383-91.
- Laakmann, G., Schule, C., Baghai, T. und Kieser, M. (1998). "St. John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy." *Pharmacopsychiatry* **31 Suppl 1**: 54-9.
- Labbe, L., Sirois, C., Pilote, S., Arseneault, M., Robitaille, N. M., Turgeon, J., et al. (2000). "Effect of gender, sex hormones, time variables and physiological urinary pH on apparent CYP2D6 activity as assessed by metabolic ratios of marker substrates." *Pharmacogenetics* **10**(5): 425-38.
- Ladas, J. A., Hadzopoulou-Cladaras, M., Kardassis, D., Cardot, P., Cheng, J., Zannis, V., et al. (1992). "Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes ApoB, ApoCIII, and ApoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2, and EAR-3." *J Biol Chem* **267**(22): 15849-60.
- Lahuna, O., Rastegar, M., Maiter, D., Thissen, J. P., Lemaigre, F. P. und Rousseau, G. G. (2000). "Involvement of STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) and HNF-4 (hepatocyte nuclear factor 4) in the transcriptional control of the hnf6 gene by growth hormone." *Mol Endocrinol* **14**(2): 285-94.
- Lan, L. B., Dalton, J. T. und Schuetz, E. G. (2000). "Mdr1 limits CYP3A metabolism in vivo." *Mol Pharmacol* **58**(4): 863-9.
- Laudet, V. (1997). "Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor." *J Mol Endocrinol* **19**(3): 207-26.
- LeCluyse, E. L. (2001). "Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation." *Eur J Pharm Sci* **13**(4): 343-68.
- Lehmann, J. M., McKee, D. D., Watson, M. A., Willson, T. M., Moore, J. T. und Kliwer, S. A. (1998). "The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions." *J Clin Invest* **102**(5): 1016-23.

- Lemmens, H. J., Burm, A. G., Hennis, P. J., Gladines, M. P. und Bovill, J. G. (1990). "Influence of age on the pharmacokinetics of alfentanil. Gender dependence." Clin Pharmacokinet **19**(5): 416-22.
- Leng, X., Cooney, A. J., Tsai, S. Y. und Tsai, M. J. (1996). "Molecular mechanisms of COUP-TF-mediated transcriptional repression: evidence for transrepression and active repression." Mol Cell Biol **16**(5): 2332-40.
- Lew, K. H., Ludwig, E. A., Milad, M. A., Donovan, K., Middleton, E., Jr., Ferry, J. J., et al. (1993). "Gender-based effects on methylprednisolone pharmacokinetics and pharmacodynamics." Clin Pharmacol Ther **54**(4): 402-14.
- Li, J., Ning, G. und Duncan, S. A. (2000). "Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha." Genes Dev **14**(4): 464-74.
- Li, Y. C., Wang, D. P. und Chiang, J. Y. (1990). "Regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase in the liver. Cloning, sequencing, and regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase mRNA." J Biol Chem **265**(20): 12012-9.
- Liddle, C., Goodwin, B. J., George, J., Tapner, M. und Farrell, G. C. (1998). "Separate and interactive regulation of cytochrome P450 3A4 by triiodothyronine, dexamethasone, and growth hormone in cultured hepatocytes." J Clin Endocrinol Metab **83**(7): 2411-6.
- Lin, J. H. und Lu, A. Y. (1997). "Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development." Pharmacol Rev **49**(4): 403-49.
- Lin, Y. S., Dowling, A. L., Quigley, S. D., Farin, F. M., Zhang, J., Lamba, J., et al. (2002). "Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism." Mol Pharmacol **62**(1): 162-72.
- Ling, V. (1997). "Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance." Cancer Chemother Pharmacol **40 Suppl**: S3-8.
- Liu, L. und Klaassen, C. D. (1996). "Regulation of hepatic sulfotransferases by steroidal chemicals in rats." Drug Metab Dispos **24**(8): 854-8.
- Luo, X., Ikeda, Y. und Parker, K. L. (1994). "A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation." Cell **77**(4): 481-90.
- Madhu, C. und Klaassen, C. D. (1991). "Protective effect of pregnenolone-16 alpha-carbonitrile on acetaminophen-induced hepatotoxicity in hamsters." Toxicol Appl Pharmacol **109**(2): 305-13.
- Maglich, J. M., Sluder, A., Guan, X., Shi, Y., McKee, D. D., Carrick, K., et al. (2001). "Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, Caenorhabditis elegans and Drosophila genomes." Genome Biol **2**(8): RESEARCH0029.
- Maglich, J. M., Stoltz, C. M., Goodwin, B., Hawkins-Brown, D., Moore, J. T. und Kliewer, S. A. (2002). "Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification." Mol Pharmacol **62**(3): 638-46.
- Mangelsdorf, D. J. und Evans, R. M. (1995). "The RXR heterodimers and orphan receptors." Cell **83**(6): 841-50.
- Masuyama, H., Hiramatsu, Y., Kunitomi, M., Kudo, T. und MacDonald, P. N. (2000). "Endocrine disrupting chemicals, phthalic acid and nonylphenol, activate Pregnane X receptor-mediated transcription." Mol Endocrinol **14**(3): 421-8.

- Masuyama, H., Hiramatsu, Y., Mizutani, Y., Inoshita, H. und Kudo, T. (2001). "The expression of pregnane X receptor and its target gene, cytochrome P450 3A1, in perinatal mouse." Mol Cell Endocrinol **172**(1-2): 47-56.
- Maurice, M., Pichard, L., Daujat, M., Fabre, I., Joyeux, H., Domergue, J., et al. (1992). "Effects of imidazole derivatives on cytochromes P450 from human hepatocytes in primary culture." Faseb J **6**(2): 752-8.
- Meffin, P. J., Brooks, P. M. und Sallustio, B. C. (1984). "Alterations in prednisolone disposition as a result of time of administration, gender and dose." Br J Clin Pharmacol **17**(4): 395-404.
- Meibohm, B., Beierle, I. und Derendorf, H. (2002). "How important are gender differences in pharmacokinetics?" Clin Pharmacokinet **41**(5): 329-42.
- Merkatz, R. B., Temple, R., Subel, S., Feiden, K. und Kessler, D. A. (1993). "Women in clinical trials of new drugs. A change in Food and Drug Administration policy. The Working Group on Women in Clinical Trials." N Engl J Med **329**(4): 292-6.
- Metzger, S., Halaas, J. L., Breslow, J. L. und Sladek, F. M. (1993). "Orphan receptor HNF-4 and bZip protein C/EBP alpha bind to overlapping regions of the apolipoprotein B gene promoter and synergistically activate transcription." J Biol Chem **268**(22): 16831-8.
- Michalets, E. L. (1998). "Update: clinically significant cytochrome P-450 drug interactions." Pharmacotherapy **18**(1): 84-112.
- Mietus-Snyder, M., Sladek, F. M., Ginsburg, G. S., Kuo, C. F., Ladias, J. A., Darnell, J. E., Jr., et al. (1992). "Antagonism between apolipoprotein AI regulatory protein 1, Ear3/COUP-TF, and hepatocyte nuclear factor 4 modulates apolipoprotein CIII gene expression in liver and intestinal cells." Mol Cell Biol **12**(4): 1708-18.
- Moore, L. B., Goodwin, B., Jones, S. A., Wisely, G. B., Serabjit-Singh, C. J., Willson, T. M., et al. (2000a). "St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(13): 7500-2.
- Moore, L. B., Maglich, J. M., McKee, D. D., Wisely, B., Willson, T. M., Kliewer, S. A., et al. (2002). "Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors." Mol Endocrinol **16**(5): 977-86.
- Moore, L. B., Parks, D. J., Jones, S. A., Bledsoe, R. K., Consler, T. G., Stimmel, J. B., et al. (2000b). "Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands." J Biol Chem **275**(20): 15122-7.
- Morgan, E. T. (1993). "Down-regulation of multiple cytochrome P450 gene products by inflammatory mediators in vivo. Independence from the hypothalamo-pituitary axis." Biochem Pharmacol **45**(2): 415-9.
- Morgan, E. T., Thomas, K. B., Swanson, R., Vales, T., Hwang, J. und Wright, K. (1994). "Selective suppression of cytochrome P-450 gene expression by interleukins 1 and 6 in rat liver." Biochim Biophys Acta **1219**(2): 475-83.
- Morrisey, E. E., Tang, Z., Sigrist, K., Lu, M. M., Jiang, F., Ip, H. S., et al. (1998). "GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo." Genes Dev **12**(22): 3579-90.
- Mugford, C. A. und Kedderis, G. L. (1998). "Sex-dependent metabolism of xenobiotics." Drug Metab Rev **30**(3): 441-98.

- Nagpal, S., Saunders, M., Kastner, P., Durand, B., Nakshatri, H. und Chambon, P. (1992). "Promoter context- and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors." Cell **70**(6): 1007-19.
- Nakhei, H., Lingott, A., Lemm, I. und Ryffel, G. U. (1998). "An alternative splice variant of the tissue specific transcription factor HNF4alpha predominates in undifferentiated murine cell types." Nucleic Acids Res **26**(2): 497-504.
- Neurath, M. (1997). DNA/Protein-Interaktionen, Spektrum Akademischer Verlag.
- Nicholas, G. S. (1934). J Pharmacol Exp Ther **43**: 223-226.
- Nolte, R. T., Wisely, G. B., Westin, S., Cobb, J. E., Lambert, M. H., Kurokawa, R., et al. (1998). "Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma." Nature **395**(6698): 137-43.
- Ozdemir, V., Kalowa, W., Tang, B. K., Paterson, A. D., Walker, S. E., Endrenyi, L., et al. (2000). "Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method." Pharmacogenetics **10**(5): 373-88.
- Parker, K. L., Ikeda, Y. und Luo, X. (1996). "The roles of steroidogenic factor-1 in reproductive function." Steroids **61**(4): 161-5.
- Pascussi, J. M., Drocourt, L., Fabre, J. M., Maurel, P. und Vilarem, M. J. (2000a). "Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor-alpha expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators." Mol Pharmacol **58**(2): 361-72.
- Pascussi, J. M., Drocourt, L., Gerbal-Chaloin, S., Fabre, J. M., Maurel, P. und Vilarem, M. J. (2001). "Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor." Eur J Biochem **268**(24): 6346-58.
- Pascussi, J. M., Gerbal-Chaloin, S., Pichard-Garcia, L., Daujat, M., Fabre, J. M., Maurel, P., et al. (2000b). "Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor in primary human hepatocytes." Biochem Biophys Res Commun **274**(3): 707-13.
- Pastan, I. und Gottesman, M. M. (1991). "Multidrug resistance." Annu Rev Med **42**: 277-86.
- Pelkonen, O., Maenpaa, J., Taavitsainen, P., Rautio, A. und Raunio, H. (1998). "Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes." Xenobiotica **28**(12): 1203-53.
- Pichard, L., Fabre, I., Daujat, M., Domergue, J., Joyeux, H. und Maurel, P. (1992). "Effect of corticosteroids on the expression of cytochromes P450 and on cyclosporin A oxidase activity in primary cultures of human hepatocytes." Mol Pharmacol **41**(6): 1047-55.
- Pichard, L., Fabre, I., Fabre, G., Domergue, J., Saint Aubert, B., Mourad, G., et al. (1990). "Cyclosporin A drug interactions. Screening for inducers and inhibitors of cytochrome P-450 (cyclosporin A oxidase) in primary cultures of human hepatocytes and in liver microsomes." Drug Metab Dispos **18**(5): 595-606.
- Pincus, S. M., Gevers, E. F., Robinson, I. C., van den Berg, G., Roelfsema, F., Hartman, M. L., et al. (1996). "Females secrete growth hormone with more process irregularity than males in both humans and rats." Am J Physiol **270**(1 Pt 1): E107-15.
- Pineda Torra, I., Jamshidi, Y., Flavell, D. M., Fruchart, J. C. und Staels, B. (2002). "Characterization of the human PPARalpha promoter: identification of a functional nuclear receptor response element." Mol Endocrinol **16**(5): 1013-28.

- Pontoglio, M., Barra, J., Hadchouel, M., Doyen, A., Kress, C., Bach, J. P., et al. (1996). "Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome." Cell **84**(4): 575-85.
- Rebbeck, T. R., Jaffe, J. M., Walker, A. H., Wein, A. J. und Malkowicz, S. B. (1998). "Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4." J Natl Cancer Inst **90**(16): 1225-9.
- Relling, M. V., Lin, J. S., Ayers, G. D. und Evans, W. E. (1992). "Racial and gender differences in N-acetyltransferase, xanthine oxidase, and CYP1A2 activities." Clin Pharmacol Ther **52**(6): 643-58.
- Robinson-Rechavi, M., Carpentier, A. S., Duffraisse, M. und Laudet, V. (2001). "How many nuclear hormone receptors are there in the human genome?" Trends Genet **17**(10): 554-6.
- Runge-Morris, M., Wu, W. und Kocarek, T. A. (1999). "Regulation of rat hepatic hydroxysteroid sulfotransferase (SULT2-40/41) gene expression by glucocorticoids: evidence for a dual mechanism of transcriptional control." Mol Pharmacol **56**(6): 1198-206.
- Ruschitzka, F., Meier, P. J., Turina, M., Luscher, T. F. und Noll, G. (2000). "Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort." Lancet **355**(9203): 548-9.
- Sata, F., Sapone, A., Elizondo, G., Stocker, P., Miller, V. P., Zheng, W., et al. (2000). "CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity." Clin Pharmacol Ther **67**(1): 48-56.
- Savas, U., Wester, M. R., Griffin, K. J. und Johnson, E. F. (2000). "Rabbit pregnane X receptor is activated by rifampicin." Drug Metab Dispos **28**(5): 529-37.
- Schmidt, R., Baumann, F., Hanschmann, H., Geissler, F. und Preiss, R. (2001). "Gender difference in ifosfamide metabolism by human liver microsomes." Eur J Drug Metab Pharmacokinet **26**(3): 193-200.
- Schmucker, D. L., Woodhouse, K. W., Wang, R. K., Wynne, H., James, O. F., McManus, M., et al. (1990). "Effects of age and gender on in vitro properties of human liver microsomal monooxygenases." Clin Pharmacol Ther **48**(4): 365-74.
- Schuetz, E. G., Brimer, C. und Schuetz, J. D. (1998). "Environmental xenobiotics and the antihormones cyproterone acetate and spironolactone use the nuclear hormone pregnenolone X receptor to activate the CYP3A23 hormone response element." Mol Pharmacol **54**(6): 1113-7.
- Schuetz, E. G., Furuya, K. N. und Schuetz, J. D. (1995). "Interindividual variation in expression of P-glycoprotein in normal human liver and secondary hepatic neoplasms." J Pharmacol Exp Ther **275**(2): 1011-8.
- Schuetz, E. G., Schuetz, J. D., Strom, S. C., Thompson, M. T., Fisher, R. A., Molowa, D. T., et al. (1993). "Regulation of human liver cytochromes P-450 in family 3A in primary and continuous culture of human hepatocytes." Hepatology **18**(5): 1254-62.
- Schwab, M., Eichelbaum, M. und Fromm, M. F. (2003). "Genetic polymorphisms of the human mdr1 drug transporter." Annu Rev Pharmacol Toxicol **43**: 285-307.
- Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., et al. (1998). "The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen." Cell **95**(7): 927-37.
- Shibata, H., Nawaz, Z., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W. und Tsai, M. J. (1997). "Gene silencing by chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I (COUP-TFI) is mediated by transcriptional

- corepressors, nuclear receptor-corepressor (N-CoR) and silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor (SMRT)." *Mol Endocrinol* **11**(6): 714-24.
- Shih, D. Q., Navas, M. A., Kuwajima, S., Duncan, S. A. und Stoffel, M. (1999). "Impaired glucose homeostasis and neonatal mortality in hepatocyte nuclear factor 3alpha-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(18): 10152-7.
- Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y. und Guengerich, F. P. (1994). "Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians." *J Pharmacol Exp Ther* **270**(1): 414-23.
- Sladek, F. M. (1994). *Transcriptional Regulation of Liver-Specific Genes*. F. Tronche und Yaniv, M., R.G. Landes Company, Austin, TX, USA: 207-230.
- Sladek, F. M., Ruse, M. D., Jr., Nepomuceno, L., Huang, S. M. und Stallcup, M. R. (1999). "Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1." *Mol Cell Biol* **19**(10): 6509-22.
- Sluder, A. E., Mathews, S. W., Hough, D., Yin, V. P. und Maina, C. V. (1999). "The nuclear receptor superfamily has undergone extensive proliferation and diversification in nematodes." *Genome Res* **9**(2): 103-20.
- Stafford, J. M., Wilkinson, J. C., Beechem, J. M. und Granner, D. K. (2001). "Accessory factors facilitate the binding of glucocorticoid receptor to the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter." *J Biol Chem* **276**(43): 39885-91.
- Staudinger, J., Liu, Y., Madan, A., Habeebu, S. und Klaassen, C. D. (2001a). "Coordinate regulation of xenobiotic and bile acid homeostasis by pregnane X receptor." *Drug Metab Dispos* **29**(11): 1467-72.
- Staudinger, J. L., Goodwin, B., Jones, S. A., Hawkins-Brown, D., MacKenzie, K. I., LaTour, A., et al. (2001b). "The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(6): 3369-74.
- Strom, S. C., Pisarov, L. A., Dorko, K., Thompson, M. T., Schuetz, J. D. und Schuetz, E. G. (1996). "Use of human hepatocytes to study P450 gene induction." *Methods Enzymol* **272**: 388-401.
- Subramanian, A., Teixeira, J., Wang, J. und Gil, G. (1995). "A STAT factor mediates the sexually dimorphic regulation of hepatic cytochrome P450 3A10/lithocholic acid 6 beta-hydroxylase gene expression by growth hormone." *Mol Cell Biol* **15**(9): 4672-82.
- Sueyoshi, T., Kawamoto, T., Zelko, I., Honkakoski, P. und Negishi, M. (1999a). "The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene." *J Biol Chem* **274**(10): 6043-6.
- Sueyoshi, T., Yokomori, N., Korach, K. S. und Negishi, M. (1999b). "Developmental action of estrogen receptor-alpha feminizes the growth hormone-Stat5b pathway and expression of Cyp2a4 and Cyp2d9 genes in mouse liver." *Mol Pharmacol* **56**(3): 473-7.
- Sund, N. J., Ang, S. L., Sackett, S. D., Shen, W., Daigle, N., Magnuson, M. A., et al. (2000). "Hepatocyte nuclear factor 3beta (Foxa2) is dispensable for maintaining the differentiated state of the adult hepatocyte." *Mol Cell Biol* **20**(14): 5175-83.
- Synold, T. W., Dussault, I. und Forman, B. M. (2001). "The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux." *Nat Med* **7**(5): 584-90.

- Takeshita, A., Koibuchi, N., Oka, J., Taguchi, M., Shishiba, Y. und Ozawa, Y. (2001). "Bisphenol-A, an environmental estrogen, activates the human orphan nuclear receptor, steroid and xenobiotic receptor-mediated transcription." Eur J Endocrinol **145**(4): 513-7.
- Tanaka, E. (1999). "Gender-related differences in pharmacokinetics and their clinical significance." J Clin Pharm Ther **24**(5): 339-46.
- Tegude, H. (2003). Untersuchungen zur Regulation der Expression des humanen Cytochrom P450 3A4-Gens. Fakultät Naturwissenschaften. Stuttgart, Hohenheim.
- Teixeira, J. und Gil, G. (1991). "Cloning, expression, and regulation of lithocholic acid 6 beta-hydroxylase." J Biol Chem **266**(31): 21030-6.
- Thummel, K. E. und Wilkinson, G. R. (1998). "In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A." Annu Rev Pharmacol Toxicol **38**: 389-430.
- Tian, J. M. und Schibler, U. (1991). "Tissue-specific expression of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 may involve hepatocyte nuclear factor 4." Genes Dev **5**(12A): 2225-34.
- Tirona, R. G., Lee, W., Leake, B. F., Lan, L. B., Cline, C. B., Lamba, V., et al. (2003). "The orphan nuclear receptor HNF4alpha determines PXR- and CAR-mediated xenobiotic induction of CYP3A4." Nat Med **9**(2): 220-4.
- Torchia, J., Glass, C. und Rosenfeld, M. G. (1998). "Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses." Curr Opin Cell Biol **10**(3): 373-83.
- Transon, C., Leemann, T. und Dayer, P. (1996). "In vitro comparative inhibition profiles of major human drug metabolising cytochrome P450 isozymes (CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4) by HMG-CoA reductase inhibitors." Eur J Clin Pharmacol **50**(3): 209-15.
- Tsai, S. Y. und Tsai, M. J. (1997). "Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs): coming of age." Endocr Rev **18**(2): 229-40.
- Tucker, G. T., Rostami-Hodjegan, A. und Jackson, P. R. (1998). "Determination of drug-metabolizing enzyme activity in vivo: pharmacokinetic and statistical issues." Xenobiotica **28**(12): 1255-73.
- Umesono, K. und Evans, R. M. (1989). "Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors." Cell **57**(7): 1139-46.
- van den Berg, G., Veldhuis, J. D., Frolich, M. und Roelfsema, F. (1996). "An amplitude-specific divergence in the pulsatile mode of growth hormone (GH) secretion underlies the gender difference in mean GH concentrations in men and premenopausal women." J Clin Endocrinol Metab **81**(7): 2460-7.
- Venkatesan, K. (1992). "Pharmacokinetic drug interactions with rifampicin." Clin Pharmacokinet **22**(1): 47-65.
- Voegel, J. J., Heine, M. J., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P. und Gronemeyer, H. (1998). "The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways." Embo J **17**(2): 507-19.
- Wacher, V. J., Wu, C. Y. und Benet, L. Z. (1995). "Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy." Mol Carcinog **13**(3): 129-34.
- Wandel, C., Kim, R., Wood, M. und Wood, A. (2002). "Interaction of morphine, fentanyl, sufentanil, alfentanil, and loperamide with the efflux drug transporter P-glycoprotein." Anesthesiology **96**(4): 913-20.

- Wang, H., Faucette, S. R., Gilbert, D., Jolley, S. L., Sueyoshi, T., Negishi, M., et al. (2003). "Glucocorticoid receptor enhancement of pregnane X receptor-mediated CYP2B6 regulation in primary human hepatocytes." Drug Metab Dispos **31**(5): 620-30.
- Wang, J. C., Stafford, J. M. und Granner, D. K. (1998). "SRC-1 and GRIP1 coactivate transcription with hepatocyte nuclear factor 4." J Biol Chem **273**(47): 30847-50.
- Watkins, P. B. (1994). "Noninvasive tests of CYP3A enzymes." Pharmacogenetics **4**(4): 171-84.
- Watkins, P. B., Murray, S. A., Winkelman, L. G., Heuman, D. M., Wrighton, S. A. und Guzelian, P. S. (1989). "Erythromycin breath test as an assay of glucocorticoid-inducible liver cytochromes P-450. Studies in rats and patients." J Clin Invest **83**(2): 688-97.
- Watkins, P. B., Wrighton, S. A., Maurel, P., Schuetz, E. G., Mendez-Picon, G., Parker, G. A., et al. (1985). "Identification of an inducible form of cytochrome P-450 in human liver." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(18): 6310-4.
- Watkins, R. E., Maglich, J. M., Moore, L. B., Wisely, G. B., Noble, S. M., Davis-Searles, P. R., et al. (2003). "2.1 A crystal structure of human PXR in complex with the St. John's wort compound hyperforin." Biochemistry **42**(6): 1430-8.
- Watkins, R. E., Wisely, G. B., Moore, L. B., Collins, J. L., Lambert, M. H., Williams, S. P., et al. (2001). "The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity." Science **292**(5525): 2329-33.
- Waxman, D. J. (1999). "P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR." Arch Biochem Biophys **369**(1): 11-23.
- Waxman, D. J., Pampori, N. A., Ram, P. A., Agrawal, A. K. und Shapiro, B. H. (1991). "Interpulse interval in circulating growth hormone patterns regulates sexually dimorphic expression of hepatic cytochrome P450." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(15): 6868-72.
- Waxman, D. J., Ram, P. A., Park, S. H. und Choi, H. K. (1995). "Intermittent plasma growth hormone triggers tyrosine phosphorylation and nuclear translocation of a liver-expressed, Stat 5-related DNA binding protein. Proposed role as an intracellular regulator of male-specific liver gene transcription." J Biol Chem **270**(22): 13262-70.
- Weatherman, R. V., Fletterick, R. J. und Scanlan, T. S. (1999). "Nuclear-receptor ligands and ligand-binding domains." Annu Rev Biochem **68**: 559-81.
- Wentworth, J. M., Agostini, M., Love, J., Schwabe, J. W. und Chatterjee, V. K. (2000). "St John's wort, a herbal antidepressant, activates the steroid X receptor." J Endocrinol **166**(3): R11-6.
- White, R., Sjoberg, M., Kalkhoven, E. und Parker, M. G. (1997). "Ligand-independent activation of the oestrogen receptor by mutation of a conserved tyrosine." Embo J **16**(6): 1427-35.
- Wilkinson, G. R. (1996). "Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism: prediction of in vivo activity in humans." J Pharmacokinet Biopharm **24**(5): 475-90.
- Wilson, T. E., Fahrner, T. J. und Milbrandt, J. (1993). "The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction." Mol Cell Biol **13**(9): 5794-804.
- Winer, L. M., Shaw, M. A. und Baumann, G. (1990). "Basal plasma growth hormone levels in man: new evidence for rhythmicity of growth hormone secretion." J Clin Endocrinol Metab **70**(6): 1678-86.

- Wolbold, R., Klein, K., Burk, O., Nüssler, A.K., Neuhaus, P., Eichelbaum, M., Schwab, M., Zanger, U.M. (2003). "Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver." *Hepatology* **38**(4): 978-88.
- Wright, M. C. (1999). "The cytochrome P450 3A4 inducer metyrapone is an activator of the human pregnane X receptor." *Biochem Soc Trans* **27**(4): 387-91.
- Wright, M. C., Maurel, P. und Paine, A. J. (1996). "Induction of cytochrome P450 3A by metyrapone in human hepatocyte culture." *Hum Exp Toxicol* **15**(3): 203-4.
- Wrighton, S. A. und Stevens, J. C. (1992). "The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism." *Crit Rev Toxicol* **22**(1): 1-21.
- Wyde, M. E., Bartolucci, E., Ueda, A., Zhang, H., Yan, B., Negishi, M., et al. (2003). "The Environmental Pollutant 1,1-Dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)ethylene Induces Rat Hepatic Cytochrome P450 2B and 3A Expression through the Constitutive Androstane Receptor and Pregnane X Receptor." *Mol Pharmacol* **64**(2): 474-81.
- Xie, W., Barwick, J. L., Downes, M., Blumberg, B., Simon, C. M., Nelson, M. C., et al. (2000a). "Humanized xenobiotic response in mice expressing nuclear receptor SXR." *Nature* **406**(6794): 435-9.
- Xie, W., Barwick, J. L., Simon, C. M., Pierce, A. M., Safe, S., Blumberg, B., et al. (2000b). "Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR." *Genes Dev* **14**(23): 3014-23.
- Xie, W., Radominska-Pandya, A., Shi, Y., Simon, C. M., Nelson, M. C., Ong, E. S., et al. (2001). "An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(6): 3375-80.
- Yamagata, K., Furuta, H., Oda, N., Kaisaki, P. J., Menzel, S., Cox, N. J., et al. (1996). "Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1)." *Nature* **384**(6608): 458-60.
- Yamazaki, H., Inui, Y., Wrighton, S. A., Guengerich, F. P. und Shimada, T. (1995). "Procarcinogen activation by cytochrome P450 3A4 and 3A5 expressed in Escherichia coli and by human liver microsomes." *Carcinogenesis* **16**(9): 2167-70.
- Yang, W. und Freedman, L. P. (1999). "20-Epi analogues of 1,25-dihydroxyvitamin D3 are highly potent inducers of DRIP coactivator complex binding to the vitamin D3 receptor." *J Biol Chem* **274**(24): 16838-45.
- Zechel, C., Shen, X. Q., Chambon, P. und Gronemeyer, H. (1994a). "Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements." *Embo J* **13**(6): 1414-24.
- Zechel, C., Shen, X. Q., Chen, J. Y., Chen, Z. P., Chambon, P. und Gronemeyer, H. (1994b). "The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats." *Embo J* **13**(6): 1425-33.
- Zhang, H., LeCulyse, E., Liu, L., Hu, M., Matoney, L., Zhu, W., et al. (1999). "Rat pregnane X receptor: molecular cloning, tissue distribution, and xenobiotic regulation." *Arch Biochem Biophys* **368**(1): 14-22.
- Zhang, J., Kuehl, P., Green, E. D., Touchman, J. W., Watkins, P. B., Daly, A., et al. (2001). "The human pregnane X receptor: genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants." *Pharmacogenetics* **11**(7): 555-72.

6 ANHANG

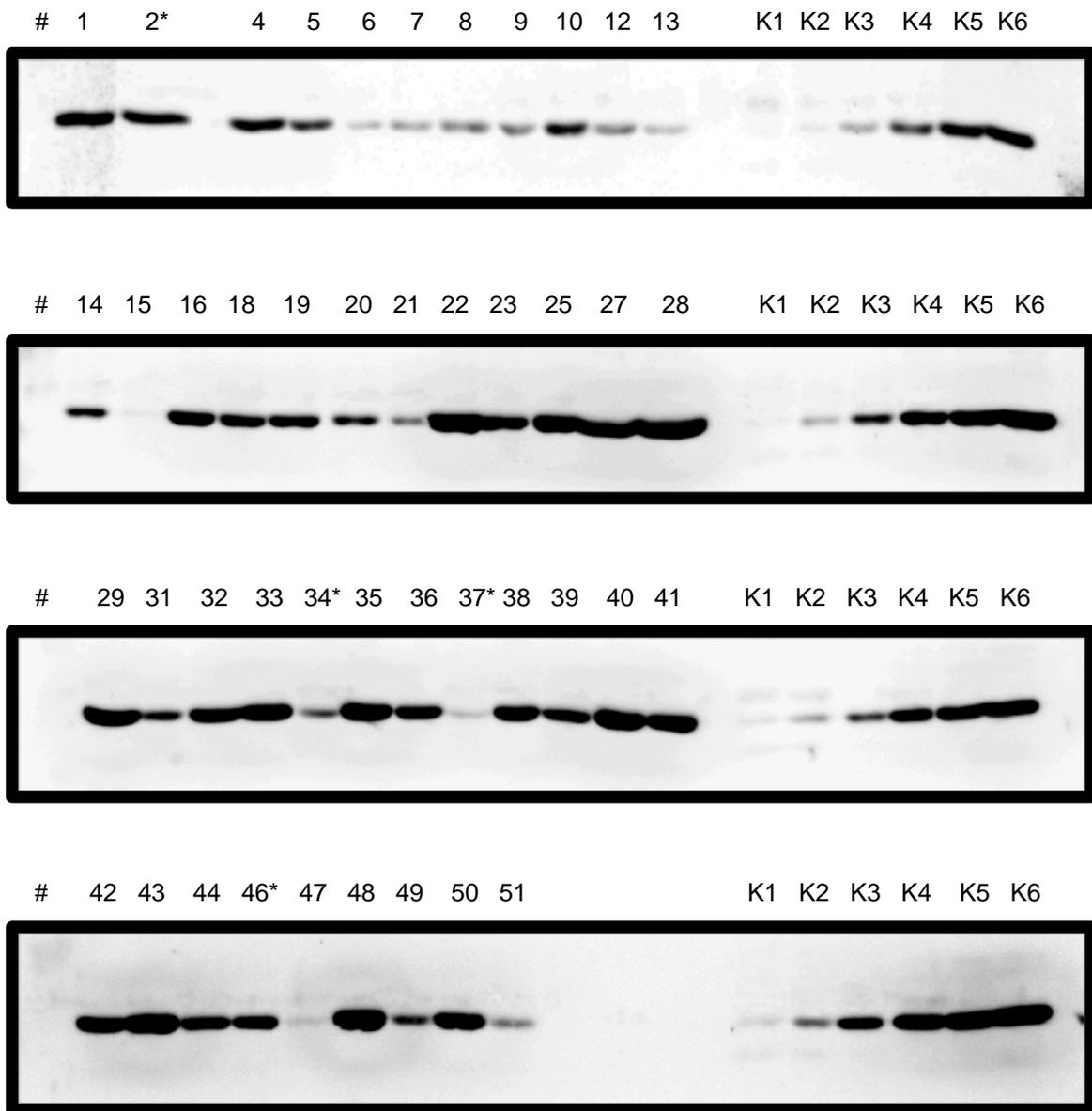


Abbildung 31.

Bestimmung der Cytochrom P450 3A4 Expression in der mikrosomalen Fraktion humaner Leberproben durch *Western Blot* Immunodetektion von jeweils 12,5 µg mikrosomaler Proteinfraction nach Elektrophorese im 10%igen Polyacrylamidgel.

K1-K6: Kalibrierproben mit 62,5, 125, 250, 500, 1000 und 2000 fmol rekombinatem P450 3A4

* aus der Analyse ausgeschlossene Patienten (Alkoholabusus, Lebercirrhose, etc.)

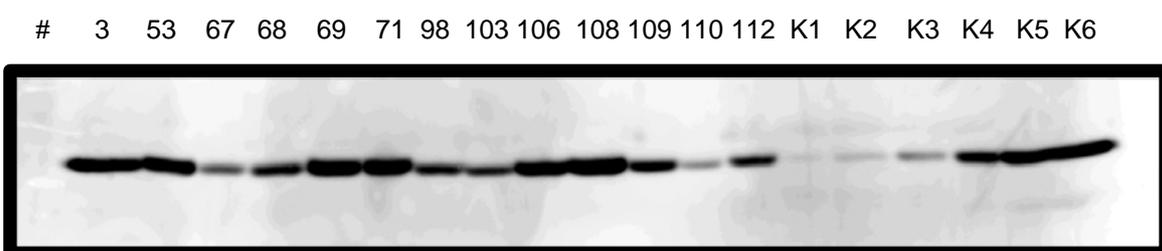
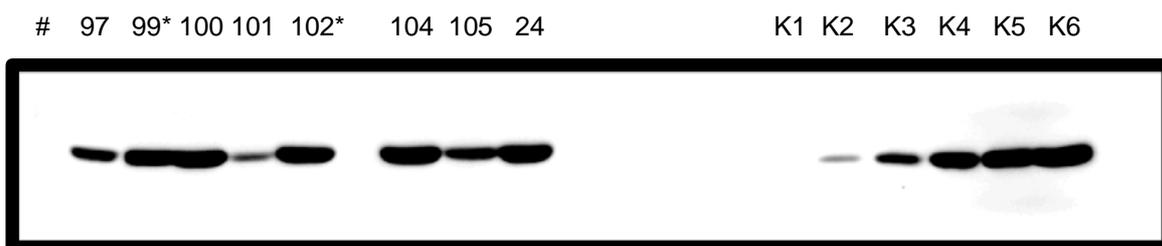
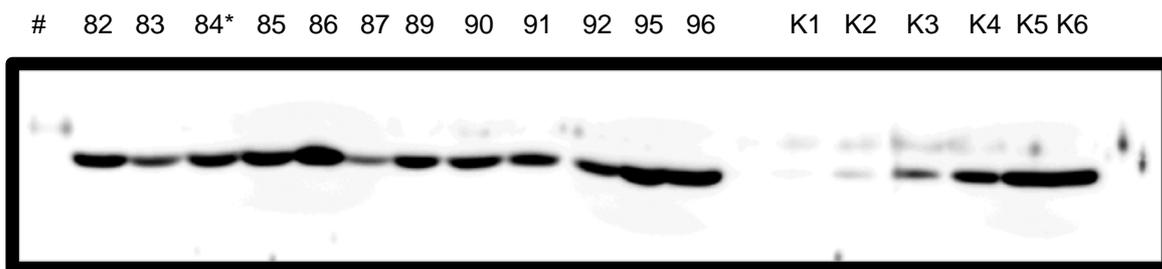
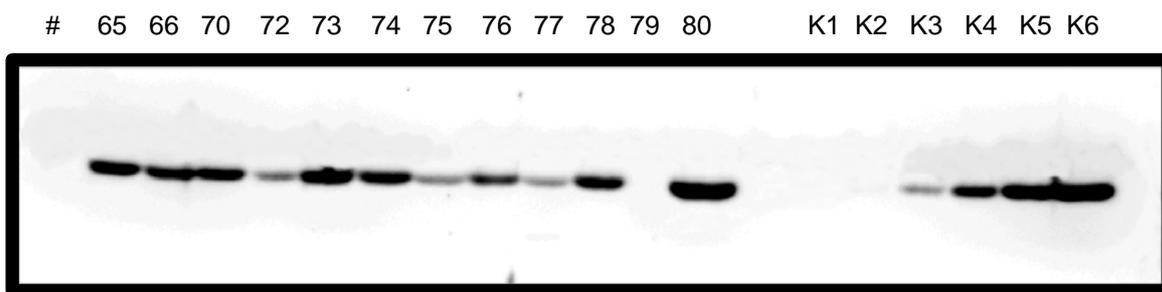
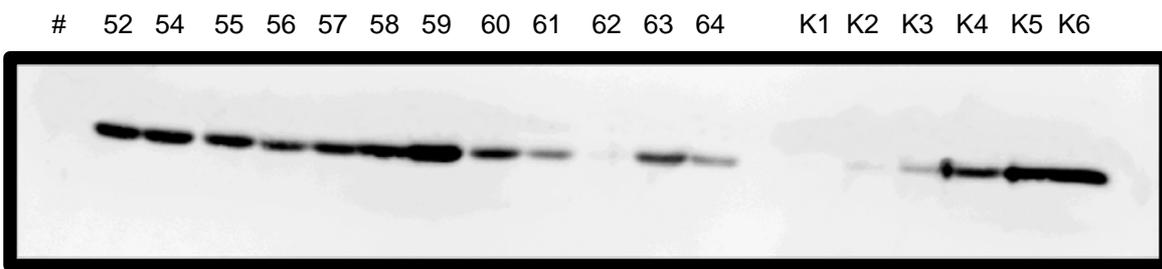


Tabelle 16. Geschlecht, Prämedikationsstatus, Alter, CYP3A4 Protein-, mRNA und PXR mRNA Expressionsdaten der einzelnen Individuen der Studie IKP148.

Patient #	m/w	Medikation	Alter	CYP3A4 Protein [pmol/mg]	CYP3A4 mRNA Relativ zu #47	PXR mRNA relativ zu #112
1	w	ja	?	266,0	37,48	7,41
3	w	nein	37	177,0	39,26	10,42
4	w	nein	55	90,3	55,00	13,15
5	m	nein	11	37,0	6,72	3,18
6	m	nein	63	11,5	18,68	6,84
7	m	nein	69	15,9	11,65	7,03
8	m	nein	64	26,3	21,48	4,19
9	w	ja	70	20,3	6,16	5,78
10	w	ja	64	53,4	27,72	7,79
12	m	nein	52	23,8	30,20	10,00
13	m	ja	59	13,8	7,34	1,70
14	m	nein	73	18,7	4,30	3,88
15	m	nein	63	6,6	3,61	4,48
16	m	nein	36	53,0	15,51	9,47
18	w	ja	77	32,8	6,32	9,38
19	w	ja	60	37,2	13,93	7,86
20	m	ja	49	26,0	11,24	4,27
21	m	ja	53	11,3	12,88	5,80
22	w	ja	76	186,0	19,59	2,14
23	m	ja	62	50,2	7,52	3,93
24	w	ja	70	58,2	9,93	6,51
25	w	ja	61	96,4	19,81	4,14
27	m	ja	61	29,4	36,03	17,38
28	w	nein	68	55,6	22,52	5,74
29	m	ja	58	195,0	28,33	7,88
31	w	ja	59	22,8	5,02	3,03
32	w	ja	68	104,6	10,60	6,64
33	w	nein	55	187,0	31,66	10,85
35	m	ja	69	245,0	50,84	10,14
36	m	ja	56	69,0	11,27	6,96
38	w	ja	49	100,8	24,56	7,01
39	w	ja	70	49,5	21,72	5,68
40	w	ja	57	295,0	39,77	7,73
41	w	ja	59	188,0	25,56	3,63
42	m	ja	56	42,5	18,86	7,32
43	w	nein	70	117,8	18,88	4,92
44	m	ja	56	21,2	12,22	6,65
47	m	ja	61	7,4	1,00	3,42
48	w	nein	66	130,1	22,39	8,25
49	m	nein	?	10,6	7,64	6,50
50	w	ja	63	36,6	11,00	7,06
51	m	nein	14	8,4	7,05	5,52
52	m	nein	59	76,1	13,65	5,66
53	m	nein	65	83,0	38,20	9,86
54	w	nein	58	76,3	11,94	6,38
55	w	ja	64	62,2	15,69	6,00
56	w	nein	59	39,9	12,96	4,48

Patient #	m/w	Medikation	Alter [a]	CYP3A4 Protein [pmol/mg]	CYP3A4 mRNA relativ zu #47	PXR mRNA relativ zu #112
57	w	nein	27	49,2	18,83	4,39
58	m	nein	55	72,1	23,95	10,99
59	w	ja	58	264,0	34,37	9,88
60	w	ja	48	45,2	51,93	13,45
61	m	ja	71	20,7	8,28	4,11
62	m	ja	50	8,6	6,86	4,32
63	w	ja	73	35,4	15,73	5,04
64	w	nein	64	16,8	22,12	8,91
65	w	ja	72	56,5	14,34	7,56
66	m	nein	68	44,0	7,88	3,24
67	m	nein	37	14,0	12,12	8,00
68	m	nein	49	44,0	9,42	2,03
69	w	ja	85	157,0	9,01	4,63
70	w	ja	71	45,4	10,39	3,62
71	w	nein	36	142,0	16,02	8,65
72	m	ja	60	18,9	3,94	4,07
73	m	nein	48	61,4	11,76	3,20
74	m	nein	4	43,0	2,99	1,01
75	m	nein	66	18,4	6,81	2,75
76	w	ja	67	28,5	9,54	3,30
77	m	ja	79	16,4	4,62	3,45
78	w	ja	61	41,9	10,22	3,54
79	w	nein	8	19,4	2,41	1,07
80	w	ja	74	114,1	7,68	2,33
82	w	nein	58	65,8	16,42	3,20
83	m	nein	23	24,9	9,89	5,28
85	w	ja	64	85,0	13,40	8,15
86	m	ja	73	236,0	43,39	5,79
87	m	nein	50	16,6	8,84	3,91
89	w	nein	36	48,5	30,42	8,47
90	m	ja	74	51,4	4,19	1,40
91	w	ja	70	42,2	4,66	2,72
92	m	ja	70	36,9	12,54	4,35
95	m	ja	76	165,0	26,89	6,78
96	w	ja	61	176,0	17,34	2,96
97	m	nein	58	17,3	5,92	4,25
98	m	nein	59	44,0	12,05	4,18
100	m	ja	55	68,5	13,02	4,64
101	m	ja	31	11,3	15,35	11,63
103	m	ja	39	36,0	11,67	6,54
104	w	nein	49	77,3	8,68	3,17
105	w	ja	73	21,0	2,82	2,29
106	w	nein	51	111,0	9,09	3,01
108	w	ja	42	187,0	30,48	4,29
109	m	ja	65	36,0	1,46	1,77
110	m	ja	63	6,0	2,12	1,51
112	m	ja	50	32,0	1,67	1,00

DANKSAGUNG

Herrn Professor Michel Eichelbaum danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, seine wertvollen Anregungen und die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie anfertigen zu können.

Herrn Professor Michael Schwarz möchte ich für seine Unterstützung und für die Bereitschaft danken, die Arbeit von seiten des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie und der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen zu betreuen.

Besonderen Dank möchte ich meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Dr. Oliver Burk für seine Betreuung aussprechen. Seine ständige Gesprächsbereitschaft, die gemeinsamen wissenschaftlichen Diskussionen und seine theoretischen und experimentellen Tipps waren von unschätzbarem Wert und haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Ulrich M. Zanger und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe Frau Dr. Kathrin Klein und Herrn Igor Liebermann danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Lebergewebeproben sowie zahlreicher RNA- und Protein-Präparationen.

Für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Dr. Margarete Fischer-Bosch-Instituts für Klinische Pharmakologie bedanken, insbesondere bei den Kolleginnen meiner Arbeitsgruppe Frau Katja A. Arnold, Frau Karina Abuazi de Paulus und Frau Dr. Heike Tegude.

Besonders Danken möchte ich außerdem Frau Dr. Bettina Klein, Herrn Dr. Hartmut Gläser und Herrn Jörg Zukunft für Freundschaft, Hilfestellung und streng wissenschaftliche und gänzlich unwissenschaftliche Diskussionen.

LISTE DER AKADEMISCHEN LEHRER

Prof. Dr. Michel Eichelbaum

Prof. Dr. Michael Schwarz

Prof. Dr. Karl Walter Bock

Prof. Dr. Hansgeorg Probst

Prof. Dr. Bernd Hamprecht

Prof. i. R. Ph. Dr. Hanspaul Hagenmaier

Dr. Oliver Burk

LEBENS LAUF

Geburtsdatum	10. August 1973
Geburtsort	Stuttgart
Eltern	Roland Walter Wolbold Ute Anita Wolbold geb. Klossner
Schulbildung und Studium	08/1984 - 06/1993 Geschwister-Scholl-Gymnasium Stuttgart-Sillenbuch 10/1993 - 02/1994 Studium der Chemie Eberhard Karls Universität Tübingen 04/1994 - 04/2000 Studium der Biochemie Eberhard Karls Universität Tübingen 05/2000 - 06/2003 Doktorand am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart