

**Transkriptionelle Aktivierung  
der humanen UDP-Glucuronosyltransferase  
Isoform UGT1A6  
durch Induktoren vom Antioxidantien-Typ**

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2002

vorgelegt von  
Stefan Schmohl

Tag der mündlichen Prüfung :

16. Januar 2002

Dekan :

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter :

Prof. Dr. K.W. Bock

2. Berichterstatter :

Prof. Dr. M. Schwarz

Die vorliegende Arbeit wurde von September 1998 bis Februar 2001 unter der Anleitung von Prof. Dr. K.W. Bock am Institut für Toxikologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht :

**Münzel P.A., Schmohl S., Heel H., Kälberer K., Bock-Hennig B.S., Bock K.W.; 1999**

Induction of human UDP glucuronosyltransferases (UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7) by t-butylhydroquinone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Caco-2 cells.

*Drug Metab Dispos ; 27(5):569-73*

## **Danksagungen**

Herrn Prof. K.W. Bock danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die intensive Förderung.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn PD Dr. P.A. Münzel für die intensive Betreuung, die immer fruchtbaren Ratschläge, seine große Geduld und seine freundschaftliche Unterstützung bedanken.

Herzlichen Dank auch Herrn Dr. Christoph Köhle für seine wohl unerschöpfliche Hilfsbereitschaft und Geduld bei der Diskussion fachlicher Fragen, Frau Birgit Kaltschmitt und Frau Ingrid Voith für die wertvolle "moralische" und technische Unterstützung und Frau Annette von Bank und Frau Brigitte Mahr für die Hilfe bei organisatorischen Fragen.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Toxikologie sei für die ausgesprochen angenehme freundschaftliche und kollegiale Atmosphäre gedankt.

**Meinen Eltern**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>2</b>
<b>1.1</b>	<b>Der Fremdstoff-Metabolismus</b>	<b>2</b>
1.1.1	Eigenschaften 'Fremdstoff-metabolisierender' Enzyme	3
1.1.2	Induktion 'Fremdstoff-metabolisierender' Enzyme	3
<b>1.2</b>	<b>UDP-Glucuronosyltransferasen</b>	<b>3</b>
1.2.1	Isoformen	4
1.2.2	Substrate und Induktoren	5
1.2.3	Die Superfamilie der UDP-Glycosyltransferasen	5
<b>1.3</b>	<b>Chemoprävention und monofunktionale Induktion</b>	<b>6</b>
1.3.1	Chemoprävention	6
1.3.2	Mono- und bifunktionale Induktoren	6
1.3.3	Wirkungsmechanismen monofunktionaler Induktoren	7
1.3.4	Wirkungsspektrum monofunktionaler Induktoren	8
<b>1.4</b>	<b>Transkriptionelle Regulation von Genen durch monofunktionale Induktoren</b>	<b>10</b>
1.4.1	Redox-Kontrolle der Transkription	10
1.4.2	Das 'Antioxidant Response Element'	11
1.4.3	Die Transkriptionsfaktoren Nrf1 und Nrf2	11
1.4.4	Transkriptionelle Regulation verschiedener Enzyme der antioxidativen Antwort	13
1.4.4.1	Glutathion-S-Transferasen	13
1.4.4.2	NAD(P)H:Chinon Oxidoreduktasen	13
1.4.4.3	$\gamma$ -Glutamylcystein Synthetasen	13
1.4.4.4	UDP-Glucuronosyltransferasen	14
<b>1.5</b>	<b>Die Caco-2-Zelllinie</b>	<b>14</b>
<b>1.6</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Allgemein benötigtes Material</b>	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Zellkulturen</b>	<b>16</b>
2.2.1	Allgemeines	16
2.2.1.1	Material	16
2.2.1.2	Medien-Herstellung und -Lagerung, Medienwechsel	17
2.2.1.3	Auftauen	17
2.2.1.4	Passagierung	17
2.2.1.5	Einfrieren	18
2.2.1.6	Behandlung	18
2.2.2	Zellkultur-Spezifisches	18
2.2.2.1	Hepa1c1c7	18
2.2.2.2	HepG2	19
2.2.2.3	Caco-2	19
<b>2.3</b>	<b>Enzymaktivitäts-Bestimmungen</b>	<b>19</b>
2.3.1	Herstellung der Zellhomogenate	19
2.3.2	Proteinbestimmung nach Lowry	20
2.3.3	UDP-Glucuronosyltransferase-Enzymtest	20
2.3.4	Chinonreduktase Enzymtest	22
2.3.5	Chinonreduktase Screening-Test	23
<b>2.4</b>	<b>Quantifizierung der UGT1A6-mRNA-Expression mittels RT-PCR</b>	<b>26</b>
2.4.1	Allgemeines	26
2.4.2	RNA-Isolation	26
2.4.3	Reverse-Transkriptase-Reaktion	27
2.4.4	Polymerase-Ketten-Reaktion	28
2.4.4.1	Primer	28
2.4.4.2	Polymerase-Ketten-Reaktion	30
2.4.4.3	Gelelektrophorese	31
2.4.4.4	Daten-Dokumentation	33

<b>2.5</b>	<b>Methoden der DNA-Rekombination</b>	<b>33</b>
2.5.1	Fragmentierung, Trennung und Isolierung von DNA-Molekülen	33
2.5.1.1	Fragmentierung von DNA-Molekülen mit Hilfe von Restriktions-Endonukleasen	33
2.5.1.2	Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten	34
2.5.1.3	Gelextraktion von DNA-Fragmenten	35
2.5.2	Quantifizierung von Polynukleotiden	35
2.5.2.1	Photometrische Bestimmung	35
2.5.2.2	Bestimmung mittels Ethidiumbromid-Fluoreszenz	36
2.5.3	Vektor- bzw. Konstrukt-Vermehrung, Plasmid-Präparation	36
2.5.3.1	Bakterien-Zellstamm	36
2.5.3.2	Allgemein verwendete Medien und Lösungen	36
2.5.3.3	Anzucht von Bakterien-Zellen	37
2.5.3.4	Herstellung kompetenter Zellen - Allgemeines	37
2.5.3.5	Herstellung kompetenter Zellen nach Hanahan	37
2.5.3.6	Herstellung kompetenter Zellen nach Inoue	38
2.5.3.7	Transformation	39
2.5.3.8	Vermehrung transformierter Bakterien ( Plasmid-Vermehrung )	40
2.5.3.9	Plasmid-Präparation	40
2.5.4	'blunt end'-Generierung	42
2.5.5	Dephosphorylierung	42
2.5.6	Ligation	43
<b>2.6</b>	<b>Konstrukt-Erstellung</b>	<b>44</b>
2.6.1	Einleitung	44
2.6.2	UGT1A6Luc-2981-Konstrukt	45
2.6.2.1	Primer	45
2.6.2.2	Linearisierung des Cosmid-Vektors	46
2.6.2.3	Präparative PCR	46
2.6.2.4	Selektive Präzipitation	47
2.6.2.5	DNA-Rekombination	48
2.6.2.6	Identifizierung	48
2.6.3	Deletionsmutanten	49
2.6.4	TkLuc-Konstrukt	50
2.6.5	UGT1A6-TkLuc-Konstrukte	50
<b>2.7</b>	<b>Transfektion</b>	<b>51</b>
2.7.1	Einleitung	51
2.7.2	DNA-Lösungen	52
2.7.3	Elektroporation	53
<b>2.8</b>	<b>Reportergen-Analyse</b>	<b>56</b>
2.8.1	Einleitung	56
2.8.2	Behandlung der Zellkulturen	56
2.8.3	Herstellung der Zellhomogenate	56
2.8.4	Messung der Reportergen-Aktivitäten	57
<b>2.9</b>	<b>GelShift-Analyse</b>	<b>58</b>
2.9.1	Herstellung der Oligonukleotid-Sonden	58
2.9.1.1	Vorbereitung der Oligonukleotide	58
2.9.1.2	Hybridisierung	58
2.9.1.3	<sup>32</sup> P-Markierung	58
2.9.1.4	Aufreinigung	59
2.9.2	Herstellung von Kernextrakten	60
2.9.3	Vorinkubation und Elektrophorese	62
2.9.3.1	Inkubation	62
2.9.3.2	Gelelektrophorese	62
<b>2.10</b>	<b>Daten-Verarbeitung</b>	<b>63</b>

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>64</b>
<b>3.1</b>	<b>Vorversuche zur Antioxidantientyp-Induktion von UGT- und Chinonreduktase-Aktivitäten in verschiedenen Zellmodellen</b>	<b>64</b>
3.1.1	Antioxidantientyp-Induktion in Caco-2- und HepG2-Zellen	64
3.1.1.1	Antioxidantientyp-Induktion der Chinonreduktase-Aktivität in der menschlichen Hepatom-Zelllinie HepG2	64
3.1.1.2	Antioxidantientyp-Induktion der Chinonreduktase-Aktivität in der menschlichen Colonkarzinom-Zelllinie Caco-2/TC7	64
3.1.1.3	Antioxidantientyp-Induktion der UGT-Aktivität in der menschlichen Hepatom-Zelllinie HepG2	65
3.1.1.4	Antioxidantientyp-Induktion der UGT-Aktivität in der menschlichen Colonkarzinom-Zelllinie Caco-2/TC7	65
3.1.2	Chinonreduktase-Screeningtest : Antioxidantientyp-Induktion in der Mäusehepatom-Zelllinie Hepa1c1c7	66
<b>3.2</b>	<b>Antioxidantientyp-Induktion der UGT1A6-mRNA-Expression</b>	<b>68</b>
3.2.1	Quantifizierung der UGT1A6-mRNA-Expression mittels Triplex-RT-PCR	68
3.2.2	Zeitverlauf der UGT1A6-mRNA-Induktion durch TBHQ und BNF	69
3.2.3	Vergleich der UGT1A6-mRNA-Induktion durch TBHQ und BNF	70
<b>3.3</b>	<b>Transkriptionelle Regulation der UGT1A6</b>	<b>70</b>
3.3.1	ARE-ähnliche Motive in der regulatorischen Sequenz der UGT1A6	70
3.3.1.1	Ermittlung einer 'Antioxidant Response Element'-Konsensus-Sequenz	70
3.3.1.2	Motive mit ARE-Konsensus-Sequenz im regulatorischen Bereich der UGT1A6	72
3.3.2	Funktionalität der ARE-ähnlichen Motive	73
3.3.2.1	Transkriptionelle und posttranskriptionelle Effekte des TBHQ auf das Reporter-gen-Modell	73
3.3.2.2	Zeitverläufe der Transkriptions-Aktivierung durch TBHQ und BNF	74
3.3.2.3	Deletions-Analyse des UGT1A6Luc-Reporter-gen-Konstrukts	75
3.3.2.4	Durch regulatorische Sequenzen der UGT1A6 vermittelte TBHQ-Induzierbarkeit des TK-Promotors	76
<b>3.4</b>	<b>GeShift-Analyse der ARE-ähnlichen Motive der regulatorischen Sequenz der UGT1A6</b>	<b>77</b>
3.4.1	Sequenz-spezifische Bindung von nukleären Proteinen an die ARE-ähnlichen Motive	77
3.4.2	Wirkung des TBHQ auf die Bindung von nukleären Proteinen an ARE-ähnliche Motive	79
<b>3.5</b>	<b>Charakterisierung der an das ARE5' bindenden Transkriptionsfaktoren</b>	<b>80</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>82</b>
<b>4.1</b>	<b>Vorversuche zur Antioxidantientyp-Induktion</b>	<b>82</b>
<b>4.2</b>	<b>Transkriptionelle Regulation der UGT1A6</b>	<b>83</b>
4.2.1	"Potentielle" ARE-ähnliche Motive der regulatorischen Sequenz der UGT1A6	83
4.2.2	Transkriptionelle Regulation der UGT1A6 durch den Antioxidantientyp-Induktor TBHQ	84
4.2.3	Deletions-Analyse der regulatorischen Sequenz der UGT1A6	84
4.2.4	Vermittlung der Induzierbarkeit auf einen 'artifizialen Promotor' durch regulatorische Sequenzen der UGT1A6	85
<b>4.3</b>	<b>Eigenschaften der ARE-ähnlichen Motive der regulatorischen Sequenz der UGT1A6</b>	<b>86</b>
4.3.1	Sequenz-spezifische Bindung von nukleären Proteinen an die ARE-ähnlichen Motive	86
4.3.2	Wirkung des TBHQ auf die Bindung von nukleären Proteinen an die ARE-ähnlichen Motive	87
<b>4.4</b>	<b>Charakterisierung der an das ARE5'-Motiv bindenden Transkriptionsfaktoren</b>	<b>87</b>
<b>4.5</b>	<b>Bedeutung der Ergebnisse</b>	<b>88</b>
<b>4.6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>90</b>
<b>5</b>	<b>Anhang</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>94</b>

A	Absorption	min	Minuten
Abb.	Abbildung	MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
Ac	Acetat bzw. Essigsäure	mRNA	'messenger Ribonucleic Acid'
AG	Aktien-Gesellschaft	MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazoliumbromid
AhR	'Aryl Hydrocarbon'-Rezeptor	MUF	4-Methylumbelliferon
APS	Ammoniumperoxodisulfat	NADH	Dihyronicotinamid-adenin-dinucleotid
ARE	'Antioxidant Response Element'	NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phoshat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	NADPH	Dihyronicotin-adenin-dinucleotid-phosphat
bp	Basen-Paare	NQO	'NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase' ( NAD(P)H:Chinon Oxidoreduktase )
BSA	'Bovine Serum Albumine' ( Rinderserumalbumin )	OD	'Optische Dichte' ( "Einheit" der Absorption )
cDNA	'complementary Deoxyribonucleic Acid' ( "reverses Transkript" von mRNA-Molekülen )	PBS	'Phosphate Buffered Saline' ( Phosphat-Puffer )
cfu	'colony-forming units' ( Kolonie-formende Einheiten )	PCR	'Polymerase Chain Reaction' ( Polymerase-Ketten-Reaktion )
dATP	2'-Deoxyadenosin-5'-triphosphat	PIPES	Piperazin-2,4-bis(2-ethansulfonsäure)
dCTP	2'-Deoxycytidin-5'-triphosphat	QR	'Quinone Reductase' ( Chinon-Reduktase )
dGTP	2'-Deoxyguanosin-5'-triphosphat	RNA	'Ribonucleic Acid' ( Ribonukleinsäure )
DH	Dehydrogenase	rpm	'rounds per minute' ( Umdrehungen pro Minute )
DMSO	Dimethylsulfoxid	rSD	'Relative SD' ( relative Standard-Abweichung )
DNA	'Deoxyribonucleic Acid' ( Deoxyribonukleinsäure )	RT	'Reverse Transcriptase' ( Reverse Transkriptase )
dNTP	2'-Deoxynukleosid-5'-triphosphat	s.o.	siehe oben
ds-DNA	doppelsträngige DNA	s.u.	siehe unten
DTT	Dithiothreitol	SD	'Standard Deviation' ( Standard-Abweichung )
dTTP	2'-Deoxythymidin-5'-triphosphat	SDS	'Sodiumdodecylsulfate' ( Natriumlaurylsulfat )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TBHQ	' <i>tert</i> -Butylhydroquinone' ( <i>tert</i> -Butylhydrochinon )
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether) N,N,N',N'-tetraessigsäure	TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid	TK	Thymidin-Kinase-Promotor
FKS	Fötale Kälber-Serum	TPA	'Phorbol-12-myristat-13-acetat'
g	9,81 m/s <sup>2</sup> ( Erdbeschleunigung )	TRE	'TPA Responsive Element'
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
GCS	'Glutamylcystein synthetase'	u	'units' ( Einheit der Enzymaktivität )
GCS <sub>h</sub>	GCS 'heavy subunit' ( schwere Untereinheit )	u.a.	unter anderem
GCS <sub>l</sub>	GCS 'light subunit' ( leichte Untereinheit )	UDP	Uridin-5'-diphosphat
ggf.	gegebenenfalls	UDPGA	UDP-α-D-Glucuronsäure
GlcA	D-Glucuronsäure	UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung	UK	'United Kingdom'
GSH	Glutathion	USA	'United States of America'
GSSG	Glutathiondisulfid	UV	'Ultra-Violett'
GST	Glutathion-S-transferase	V	Volumen
h	Stunden	vgl.	vergleiche
HEPES	2[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure	XRE	'Xenobiotic Responsive Element'
HO-1	Hämoxygenase-1	z.B.	zum Beispiel
Inc.	Incorporation		
l	Liter ( 0,001 m <sup>3</sup> )		
Lsg.	Lösung		
Luc	Luciferase-Reportergen		
M	mol/l ( 1000 mol / m <sup>3</sup> )		

SI-Einheiten und unmittelbar erklärte Kürzel sind nicht aufgeführt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Fremdstoff-Metabolismus

Die ständige Aufnahme von Fremdstoffen ( Stoffen, die nicht in den körpereigenen Stoffwechsel eingebunden werden können ), insbesondere mit der Nahrung, erfordert vom menschlichen Organismus die wirksame Ausscheidung einer Vielzahl verschiedenartiger Substanzen. Auch endogene Substanzen unterschiedlichster chemischer Struktur müssen ununterbrochen aus dem Stoffkreislauf des Gesamtorganismus eliminiert werden. Exogene Wirk- und endogene Signalstoffe müssen außerdem zunächst an geeigneter Stelle inaktiviert werden, wenn sie auf ihrem Weg zur endgültigen Ausscheidung unerwünschte Effekte entfalten können.

Aus diesen Gründen hat sich im Laufe der Evolution der Vertebraten ein System von Enzymen entwickelt, das die Verstoffwechslung verschiedenster Substanzen bewerkstelligen kann. Dabei werden zumeist im Sinne der Ausscheidung lipophile und hochmolekulare Verbindungen in gut wasserlösliche Stoffe umgewandelt, welche dann - im Gegensatz zu den Ausgangssubstanzen - leicht in die Ausscheidungsflüssigkeit überführt werden können und nicht mehr in den Körper rückdiffundieren. Man unterscheidet den Phase-I-Metabolismus, der entweder funktionelle Gruppen in apolare Moleküle einführt oder solche freisetzt ( demaskiert ), vom Phase-II-Metabolismus, welcher durch die Konjugation meist großer und sehr hydrophiler endogener Substanzen mit bereits vorhandenen oder durch die Phase-I eingeführten funktionellen Gruppen die Wasserlöslichkeit und Ausscheidbarkeit weiter erhöht. Nucleophile Gruppen werden so z.B. mit Glucuronsäure oder Sulfat, elektrophile mit Glutathion konjugiert.

Dabei sind jedoch insbesondere die von Xenobiotica durchlaufenen Metabolisierungsreaktionen in ihrer Abfolge keineswegs immer eindeutig festgelegt. Oft konkurrieren z.B. Phase-II- und Phase-I-Reaktionen um gleiche Metabolite, womit das Ausmaß der in einem Gewebe exprimierten Enzymaktivitäten entscheidend für Art und Umfang der letztendlich entstehenden Stoffwechselprodukte werden kann.

Schließlich können durch das Enzymsystem endogene Signal- und exogene Wirkstoffe nicht nur inaktiviert, sondern auch im Sinne einer Aktivierung erst erzeugt werden. Für die physiologischen, pharmazeutischen bzw. toxischen Effekte ist auch hier die Art und das Ausmaß der in einem Gewebe bzw. Individuum exprimierten Enzymaktivitäten entscheidend.

Die beschriebenen Umsetzungen werden im allgemeinen, trotz der gleichermaßen wichtigen Beteiligung endogener Substrate, unter dem Begriff 'Fremdstoffmetabolismus' zusammengefaßt und die beteiligten Enzyme 'Fremdstoff-metabolisierende Enzyme' genannt. Aufgrund ihrer äußerst wichtigen regulativen Funktion im Zusammenhang mit bestimmten endogenen Signalstoffen ( s.u. ) wurden sie jedoch auch als 'Rezeptorliganden-metabolisierende Enzyme' bezeichnet ( Nebert D.W., 1994 ).

Neuerdings werden dem Fremdstoffmetabolismus auch sogenannte 'Phase-III'-Reaktionen zugeordnet, die bei der - insbesondere im Zusammenhang mit der Behandlung von Krebserkrankungen mit Cytostatika auftretenden - Entwicklung der 'Multi Drug Resistance' eine wichtige Rolle spielen. Dabei werden unter anderem auch solche Substanzen, die einer Inaktivierung durch Phase-I- bzw. Phase-II-Reaktionen entgehen können ( deshalb 'Phase-III' ), durch spezifische, ATP hydrolysierende Transporter ( z.B. P-Glykoprotein ) aus dem Zellinneren in den Extrazellularraum geschafft und damit in ihrer Wirksamkeit beeinträchtigt ( Ishikawa T., 1992 ; Gottesman M.M., Pastan I., 1993 ; Gottesman M.M. et al., 1996 ).

### 1.1.1 Eigenschaften 'Fremdstoff-metabolisierender' Enzyme

Die meisten am Fremdstoffmetabolismus beteiligten Enzyme haben sich zufolge phylogenetischer Verwandtschaftsbeziehungen mit hoher Wahrscheinlichkeit aus sehr alten, bereits vor der Divergenz von Pro- und Eukaryonten existierenden Vorläufern entwickelt. Diese Vorläufer organisierten und koordinierten vermutlich grundlegende zelluläre Funktionen, indem sie Fließgleichgewichte endogener Substanzen und damit die Liganden-modulierte Transkription entsprechender Gene kontrollierten ( Nebert D.W., 1994 ).

Die im Verlaufe der Evolution verhältnismäßig spät übernommene Aufgabenstellung der Verstoffwechslung von Fremdstoffen stellte an das Enzymsystem grundsätzlich neue Anforderungen. Nicht zuletzt aufgrund der stetigen Neuentwicklung von als "Fraßschutz" dienenden pflanzlichen Inhaltsstoffen mußte eine Vielzahl sich ständig verändernder Substanzen aus unterschiedlichsten chemischen Klassen metabolisiert werden können. Gleichzeitig durften die Aufgaben bei der Kontrolle "interner" Funktionen nicht beeinträchtigt werden.

Bei den höheren Organismen hat sich dementsprechend mit dem Fremdstoffmetabolismus ein System entwickelt, das zum einen über Enzyme mit außerordentlich breiten Substratspezifitäten verfügt. Zum anderen haben sich Enzymfamilien und Superfamilien mit einer großen Anzahl an Mitgliedern gebildet, so daß sowohl recht spezifische Isoformen die Verstoffwechslung endogener Substanzen gewährleisten konnten als auch sich gegenseitig ergänzende Isoformen mit breiter Substratspezifität die Metabolisierung verschiedenartigster Fremdstoffe ermöglichten.

Als "Tribut" für die außerordentliche Flexibilität und Vielseitigkeit des Fremdstoffmetabolismus muß hingenommen werden, daß die nicht eindeutige Abfolge verschiedener Metabolisierungsreaktionen in ungünstigen Fällen zur "Giftung" von an sich nicht toxischen Substanzen führen kann ( Review : Bock K.W., 1991 ).

### 1.1.2 Induktion 'Fremdstoff-metabolisierender' Enzyme

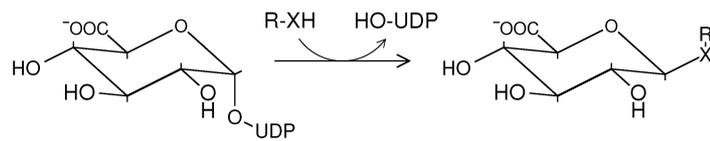
Angesichts der Tatsache, daß Änderungen bezüglich der Nahrungsaufnahme oder der Zusammensetzung in der Umwelt vorhandener Schadstoffe auch kurzfristig erfolgen können, gleichzeitig jedoch auch eine adäquate Kontrolle endogener Substrate gewährleistet werden muß, wird klar, daß eine differenzierte Regulation der Expression Fremdstoff-metabolisierender Enzyme vorhanden sein muß.

Die Induktoren Fremdstoff-metabolisierender Enzyme werden entsprechend dem Muster betroffener Enzym-Aktivitäten verschiedenen Klassen zugeordnet. Die klassische Einteilung in Induktoren vom Typ des 3-Methylcholanthrens, Phenobarbitals ( zahlreiche Arzneimittel ), Pregnenolon-16 $\alpha$ -carbonitrils, Isoniazids ( Ethanol, Aceton ) und Clofibrats ( Peroxisomenproliferatoren ) wird durch eine weitere, sogenannte bi- und monofunktionale Induktoren unterscheidende ergänzt ( Prochaska H.J., Talalay P., 1988 ; Näheres siehe 1.3.2 ).

## 1.2 UDP-Glucuronosyltransferasen

Die UDP-Glucuronosyltransferasen werden, wie bereits erwähnt, der Phase-II des Fremdstoffmetabolismus zugeordnet. Sie katalysieren die Übertragung des Glucuronsäure-Anteils des Kosubstrats UDP-Glucuronsäure auf nucleophile Gruppen ( -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -COOH ) von sowohl endo- als auch exogenen Substraten ( Abb. 1 ). Die Konjugation führt häufig zu molekularen Massen, die eine Ausscheidung in die Galle ermöglichen.

**Abb. 1 :** Die von UDP-Glucuronosyltransferasen katalysierte Konjugationsreaktion. Als Kosubstrat dient UDP-Glucuronsäure. Am anomeren C-Atom findet bei der Umsetzung eine Inversion von der  $\alpha$ - in die  $\beta$ -Konfiguration statt. X stellt ein nucleophiles Heteroatom dar.



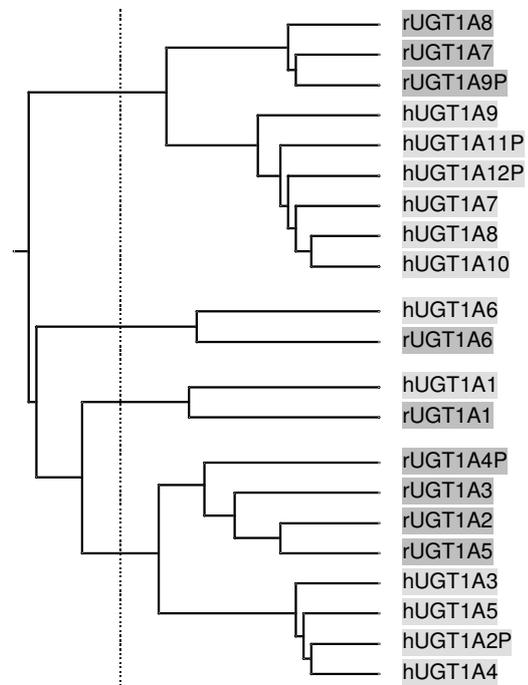
UDP-Glucuronosyltransferasen kommen als Bestandteile der Membranen des Endoplasmatischen Retikulums und der Kernhülle vor und agieren dort vermutlich grundsätzlich als Di- oder Tetramere ( Peters W.H. et al., 1984 ; Gschaidmeier H., Bock K.W., 1994 ). Für die Oligomerisierung verantwortlich scheint der unmittelbare Bereich des Amino-Terminus, der mit 95 % der Aminosäurekette im Lumen positioniert ist ( Meech R., Mackenzie P.I., 1997 ). Auf eine Membran-durchspannende Domäne folgt das kurze, zum Cytoplasma hin orientierte Carboxy-terminale Ende des Polypeptids.

### 1.2.1 Isoformen

Die verschiedenen Isoformen der UDP-Glucuronosyltransferasen ( UGT ) der Säuger bilden eine Superfamilie, die zunächst in zwei Familien, 1 und 2, eingeteilt wird. Innerhalb einer Familie besteht über 45 % Sequenzhomologie. Bei einer Übereinstimmung der Sequenzen um 60 % und mehr werden die Isoformen gleichen Subfamilien, gekennzeichnet durch lateinische Buchstaben, zugeordnet. Individuelle Gene erhalten schließlich unterschiedliche arabische Ziffern ( Burchell B. et al., 1991 ; Mackenzie P.I. et al., 1997 ; Abb. 2 ).

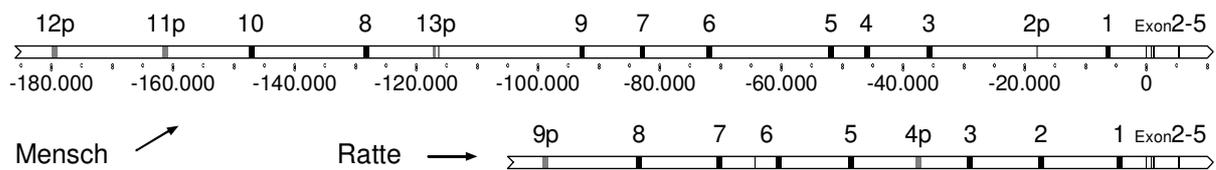
Die Isoformen der Subfamilie 1A weisen eine besonders interessante Genstruktur auf ( Ritter J.K. et al., 1992 ; Emi Y. et al., 1995 ; Abb. 3 ). Die Transkripte der unterschiedlichen Isoformen entstehen durch differentielles Spleißen individueller 1. Exons ( ca. 290 Aminosäuren codierend ) - wobei jedes mit einem eigenen Promotor ausgestattet ist - mit den gemeinsamen Exons 2 bis 5 ( ca. 250 Aminosäuren codierend ). Man ist übereingekommen, trotz der identischen Carboxy-terminalen Hälften jede Variante als Produkt eines eigenen Gens zu betrachten.

Die Isoformen der Familie 2 werden dahingegen durch individuelle, jeweils 6 Exons umfassende Gene codiert. Die durch die Exons 1 und 2 der Familie 2 und das Exon 1 der Familie 1 codierten Bereiche entsprechen sich jedoch, und alle weiteren Exon-Intron-Übergänge befinden sich an korrespondierenden Stellen ( Meech R., Mackenzie P.I., 1997 ).



**Abb. 2 :** Phylogenetischer Stammbaum der UGT1A-Familie. Isoformen des Menschen sind hellgrau, der Ratte dunkelgrau hinterlegt. Demzufolge haben sich die UGT1A1 und UGT1A6 noch vor der Trennung beider Spezies ( vertikale Linie ) von anderen Isoformen abgetrennt ( Isoschizomerie ) und der Vorläufer der UGT1A6 blieb am längsten ohne Veränderung in beiden Spezies bestehen.

Die Isoformen der Familie 2 werden dahingegen durch individuelle, jeweils 6 Exons umfassende Gene codiert. Die durch die Exons 1 und 2 der Familie 2 und das Exon 1 der Familie 1 codierten Bereiche entsprechen sich jedoch, und alle weiteren Exon-Intron-Übergänge befinden sich an korrespondierenden Stellen ( Meech R., Mackenzie P.I., 1997 ).



**Abb. 3 :** Genstruktur der UGT1A-Familie des Menschen ( Ritter J.K. et al, 1992 ; Owens I.S., 2000 ; oben ) und der Ratte ( Emi Y. et al, 1995 ; unten ). Exprimierte Exons sind schwarz dargestellt, Pseudogene grau. Zahlen über der Darstellung der jeweiligen Genstruktur entsprechen der Bezeichnung der Isoform, Pseudogene sind mit einem zusätzlichen 'p' gekennzeichnet. Die Skala bei der Darstellung des menschlichen UGT1A-Genlokus gibt die Position in Basenpaaren bezüglich des Beginns des 2. Exons an.

Beim Menschen werden die einzelnen Isoformen Gewebe-spezifisch exprimiert. Zahlreiche Isoformen konnten bisher in Leber- und Darmgewebe nachgewiesen werden ( Strassburg C.P. et al., 1997 ; Strassburg C.P. et al. 1998 ), aber auch in anderen Geweben wie Nieren, Lunge, Riechschleimhaut, Hoden, und Haut kommen UDP-Glucuronosyltransferasen vor ( Ritter et al., 1992 ; Münzel et al., 1994 ; Münzel et al., 1996 ).

## 1.2.2 Substrate und Induktoren

Als typische Substrate der menschlichen Isoformen sind Bilirubin ( UGT1A1 ), tertiäre Amine ( UGT1A4 ), planare ( UGT1A6 ) und sperrige ( UGT1A9 ) Phenole, Hyodesoxycholsäure ( UGT2B4 ), 4-Hydroxyöstron ( UGT2B11 ), Morphin ( UGT2B7 ) und Dihydroxytestosteron ( 2B15 ) zu nennen ( Burchell B. et al., 1991 ). Auch Thyroxin und Retinsäuren werden glucuronidiert ( Visser T.J. et al., 1993 ; Clewell H.J. 3rd et al., 1997 ), was zeigt, daß die "Fremdstoff"-metabolisierenden Enzyme auch noch heute bei der Regulation bestimmter Signalkaskaden ( s.o. ) eine Rolle spielen. Die Isoform UGT2A1 des Menschen ist am olfaktorischen System beteiligt ( Jedlitschky G., 1999 ).

Eine Reihe von Medikamenten wird überwiegend in Form von Glucuroniden ausgeschieden, darunter z.B. Paracetamol, Oxazepam und Morphin ( Prescott L.F., 1980 ; Bock K.W. et al., 1987 ). Induktoren vom 3-Methylcholanthren-Typ erhöhen die Expression insbesondere der menschlichen Isoformen 1A6 und 1A9, solche vom Phenobarbital-Typ diejenige der Isoform 1A1 ( Bock K.W., Bock-Henning B.S., 1987 ; Burchell B. et al. 1991 ; Strassburg C.P. et al., 2000 ).

## 1.2.3 Die Superfamilie der UDP-Glycosyltransferasen

Die bisher beschriebene Superfamilie der UDP-*Glucuronosyl* transferasen ist Bestandteil der noch größeren Superfamilie der UDP-*Glycosyl* transferasen, die teilweise anstatt Glucuronsäure Galaktose, Glucose oder Xylose übertragen ( Mackenzie P.I. et al., 1997 ). Anhand einer Konsensus-Sequenz, vermutlich charakteristisch für eine an der UDP-Bindung beteiligten Region ( Mackenzie P.I., 1990 ), konnten bis 1997 110 Mitglieder identifiziert werden, unter anderem auch in Bakterien und Pflanzen. Mitglied dieser Superfamilie ist auch die im Menschen vorkommende UGT8, die Ceramid mit Galaktose konjugiert.

## 1.3 Chemoprävention und monofunktionale Induktion

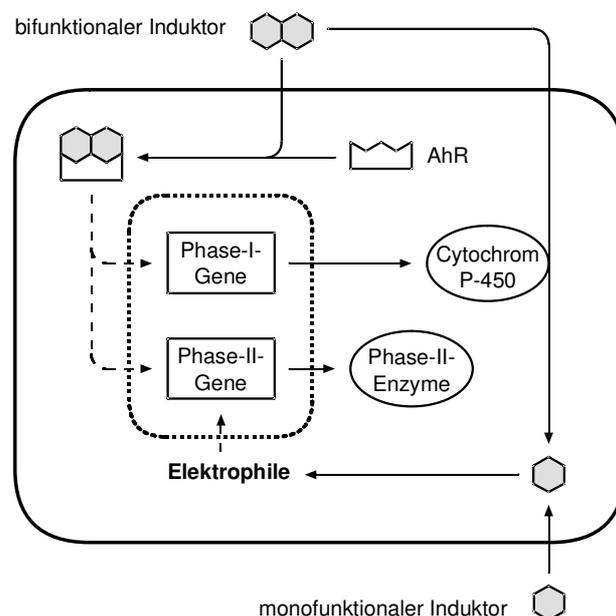
### 1.3.1 Chemoprävention

Die bei vielen Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen anzutreffende Induzierbarkeit ( hier im allgemeinen Sinne einer Erhöhung der Enzymmenge, unabhängig vom Mechanismus ) ist auch von klinischem Interesse. So kann eine 'Chemoprävention' ( auch als 'Chemoprotektion' bezeichnet ), das heißt ein durch bestimmte Nahrungsbestandteile und synthetische Verbindungen vermittelter Schutz vor toxischen Effekten insbesondere von Kanzerogenen ( Berenblum I., 1929 ), unter anderem durch die selektive Induktion solcher Enzyme des Fremdstoffmetabolismus erreicht werden, die "entgiftende" Reaktionen katalysieren ( Reviews : Stoner G.D. et al., 1997 ; Kensler T.W., 1997 ; Talalay P. et al., 1995 ). Vor dem Hintergrund, daß Reaktionen der Phase-II meist "entgiftend" wirken und häufig in direkter Konkurrenz zu "giftenden" Reaktionen der Phase I stehen wird verständlich, warum besonders solche Substanzen diese Bedingung effektiv erfüllen können, die selektiv Phase-II-Enzyme induzieren. Erfahrungsgemäß kann man sogar davon ausgehen, daß selektiv Phase-II-induzierende Stoffe immer auch eine chemopräventive Wirkung haben.

### 1.3.2 Mono- und bifunktionale Induktoren

In diesem Zusammenhang ist das Modell mono- und bifunktionaler Induktoren von besonderer Wichtigkeit ( Wattenberg L.W, 1985 ; Prochaska H.J., Talalay P., 1988 ; Abb. 4 ). Monofunktionale Induktoren induzieren vorwiegend Fremdstoff-metabolisierende Enzyme der Phase-II und sind zudem oft Bestandteil pflanzlicher Nahrung ( so z.B. das in Brokkoli enthaltene Isothiocyanat Sulforaphan ). Sie eignen sich insofern besonders gut für eine 'Chemoprävention', was auch im Tiermodell immer wieder bestätigt werden konnte ( Review : Kensler T.W., 1997 ).

Bifunktionale Induktoren führen dahingegen zunächst unter Beteiligung des 'aryl hydrocarbon'-Rezeptors ( 'AhR' ) und der 'Xenobiotic Response Elements' ( XRE ) zu einer Induktion sowohl von Phase-I- als auch Phase-II-Enzymen. Aufgrund der dadurch erhöhten Cytochrom-P<sub>450</sub>-Aktivität kann außerdem eine vermehrte Verstoffwechselung der bi- zu typischen monofunktionalen Induktoren stattfinden und damit auch deren Signalkaskaden aktiviert werden. Eine besondere Stellung nehmen unter den bifunktionalen Induktoren insofern solche Substanzen ein, die nicht zu monofunktionalen Induktoren verstoffwechselt werden können. Anhand solcher Stoffe kann experimentell die Induktion über den Ah-Rezeptor und 'Xenobiotic Response Elements' abgegrenzt werden. Als Prototyp kann man das mit äußerst hoher Affi-



**Abb. 4 :** Modell mono- und bifunktionaler Induktion. Erklärung siehe Text.

nität an den Ah-Rezeptor bindende und nicht metabolisierbare 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin ( TCDD ) ansehen.

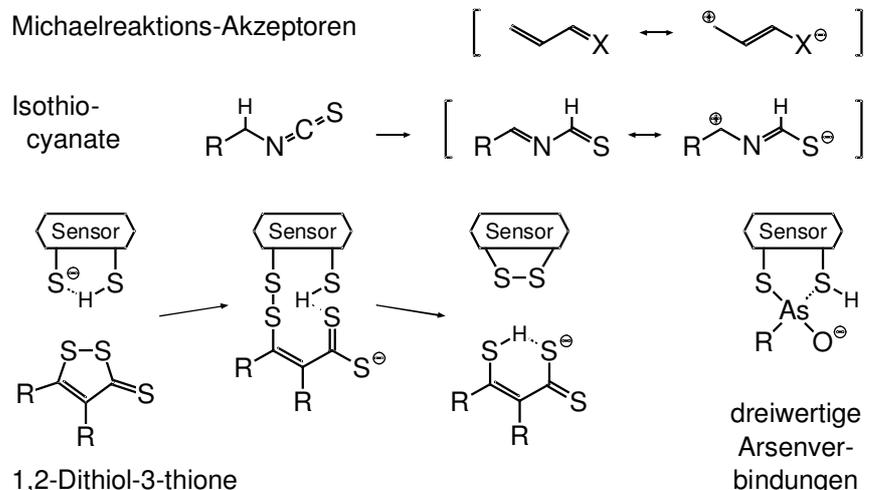
Mit die ersten Hinweise auf das Wirkprinzip vieler chemopräventiver Stoffe, die selektive ( monofunktionale ) Induktion bestimmter Fremdstoff-metabolisierender Enzyme, wurden in Untersuchungen zur Verträglichkeit synthetischer Nahrungszusätze erhalten, die Nahrungsmittel vor einer Oxidation schützen sollten ( vgl. Grantham P. et al., 1973 ). Aus diesem Grunde werden monofunktionale Induktoren bis heute auch als 'Induktoren vom Antioxidantientyp' bezeichnet - es handelt sich dabei jedoch nicht um einen Hinweis auf die biologische Wirkungsweise ( s.u. ).

### 1.3.3 Wirkungsmechanismen monofunktionaler Induktoren

Die Gruppe der monofunktionalen Induktoren umfaßt chemisch äußerst verschiedenartige Substanzen ( Pretera T. et al., 1993b ), darunter z.B. Isothiocyanate, Peroxide, dreiwertige Arsenverbindungen, Schwermetallsalze und synthetische Antioxidantien wie z.B. 2(3)-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol und dessen Metabolit *tert*-Butylhydrochinon ( TBHQ ). Gemeinsamkeit dieser Verbindungen ist es, unmittelbar oder nach Verstoffwechslung zumindest kurzfristig eine oxidative Belastung struktureller Bestandteile und/oder des Redox-Gleichgewichts der Zelle - sogenannten 'oxidativen Streß' - hervorzurufen. Da jedoch bisher nicht bekannt ist, mit Hilfe welcher molekularer Mechanismen monofunktionale Induktoren von der Zelle detektiert werden ( welcher Gestalt also der molekulare Sensor der Zelle ist ), müssen verschiedene mögliche Wirkprinzipien in Erwägung gezogen werden.

Einerseits sind viele der beteiligten Stoffgruppen Elektrophile oder können zu solchen umgesetzt werden. Dazu gehören Michaelreaktions-Akzeptoren und Isothiocyanate mit  $\alpha$ -ständigen freien Wasserstoffatomen ( Abb. 5 ), wobei sich eine sehr gute Korrelation zwischen der Reaktivität dieser Verbindungen und ihrem Induktionspotential ergibt ( Talalay P. et al., 1988 ). Unter der Annahme, daß der molekulare Sensor aus reaktiven vicinalen Sulfhydrylgruppen besteht, kann auch die unterschiedliche Wirksamkeit von Arsen- und Schwermetallverbindungen ( Pretera T. et al., 1993b ) sowie 1,2-Dithiol-3-thionen ( Pretera T. et al., 1993a ; Review : Kensler T.W. et al., 1999 ) erklärt werden.

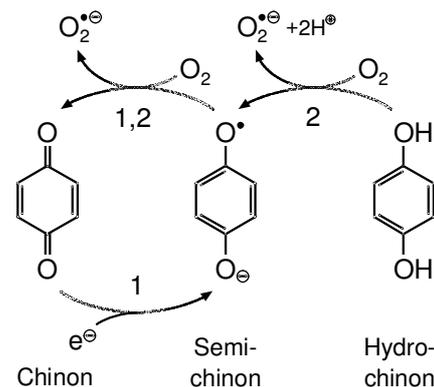
**Abb. 5 :** Postuliertes Wirkprinzip elektrophiler monofunktionaler Induktoren. Michaelreaktions-Akzeptoren und nach Tautomerisierung auch Isothiocyanate weisen durch Mesomerie mit einem elektronegativen Heteroatom ein elektrophiles Zentrum auf. Unter der Annahme, daß der molekulare Sensor reaktive vicinale Sulfhydrylgruppen enthält, kann auch die Wirksamkeit von 1,2-Dithiol-3-thionen, dreiwertigen Arsenverbindungen, Quecksilber-, Cadmium- und Zinksalzen, Peroxiden und Mercaptanen erklärt werden.



Andererseits könnten insbesondere synthetische phenolische Antioxidantien zumindest zum Teil ( die oxidierten Formen stellen ebenfalls Michaelreaktions-Akzeptoren dar ) auch aufgrund der reaktiven Sauerstoffspezies detektiert werden, die bei der Autooxidation oder in Redoxzyklen des Fremdstoffs entstehen ( Kahl R. et al., 1989 ; Pinkus R. et al., 1996 ). Ihre Wirksamkeit als Induktoren scheint mit ihrem Redoxpotential verknüpft ( Scurlock R. et al., 1996 ), was jedoch keinen Hinweis auf einen der beiden bisher beschriebenen Detektions-Mechanismen darstellt. Die antioxidativen Eigenschaften dieser Verbindungen tragen indes- sen mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht zur Induktion bei. Zum einen weisen natürliche, nicht redoxzyklisierende Antioxidantien die für monofunktionale Induktoren typischen chemoprä- ventiven Eigenschaften nicht auf ( Wattenberg L.W., 1972 ; Heinonen O.P. et al., 1994 ). Außerdem kann im Zellkulturmodell die Zugabe nicht redoxzyklisierender Antioxidantien die monofunktional induzierende Wirkung synthetischer phenolischer Verbindungen vollständig unterdrücken ( Pinkus R. et al., 1996 ).

**Abb. 6 :** Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch chinoide Verbindungen. Chinone können über 1-Elektronen-Redox- zyklen (1) oder durch Autooxidation (2) zur Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies führen.

An der 1-Elektronen-Reduktion sind unter anderem Cyto- chrom-P450, Cytochrom-P450-Reduktasen Ubichinon- und Xanthin-Oxidoreduktasen sowie Cytochrom-b5-Reduktasen beteiligt. Die Autooxidation vom Hydrochinon zum Semi- chinon ist pH-abhängig.



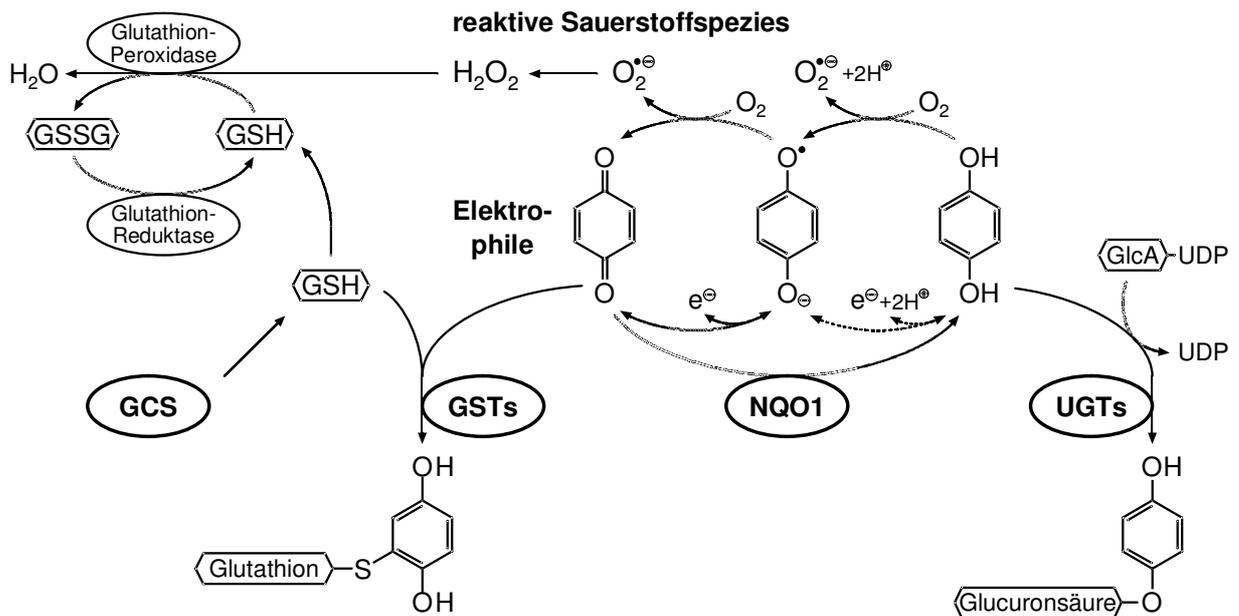
Schließlich muß als möglicher primärer "Sensor"-Mechanismus auch eine Veränderung der intrazellulären Glutathion- ( GSH- ) Konzentrationsverhältnisse in Erwägung gezogen werden ( Bergelson S., 1994 ; Li Y, Jaiswal A.K, 1994, Galter D. et al., 1994 ). Insbesondere die unter nicht oxidativ belasteten Bedingungen äußerst niedrige absolute Konzentration des Gluta- thion-Disulfids ( GSSG ; Review : Lu S.C., 1999 ) könnte durch monofunktionale Induktoren deutlich erhöht werden und so als Grundlage für eine Detektion dienen.

Eine Eingrenzung der relevanten Wirk-Prinzipien bzw. Ermittlung ihrer Beteiligung bei unter- schiedlichen Typen monofunktionaler Induktoren wird dadurch beträchtlich erschwert, daß sich die genannten Aspekte von "oxidativen Streß" in hohem Maße gegenseitig bedingen. So führt z.B. eine GSH-Depletion aufgrund beeinträchtigter Konjugation auch zur Ansammlung elektrophiler Verbindungen und aufgrund verminderter Inaktivierung zu einer verlängerten Verweildauer endogen generierter reaktiver Sauerstoffspezies. Umgekehrt können von außen eingebrachte reaktive Sauerstoffspezies das Glutathion-Gleichgewicht der Zelle beeinträchtigen und so mittelbar zu einer erhöhten Belastung durch Elektrophile führen und vice versa.

### 1.3.4 Wirkungsspektrum monofunktionaler Induktoren

Wie bereits erwähnt werden durch monofunktionale Induktoren Enzyme der Phase-II des Fremdstoffmetabolismus aktiviert, darunter die Glutathion-S-Transferasen ( GST ), die Iso- form 1 der NAD(P)H:Chinon Oxidoreduktasen ( NQO1 ) und UDP-Glucuronosyltransferasen. Daneben werden aber auch andere zur Vermittlung einer "antioxidativen Antwort" befähigte Enzyme induziert, so z.B. die  $\gamma$ -Glutamylcystein Synthetase ( GCS ) und die Isoform 1 der Hämoxygenasen ( HO-1, führt zur Verstoffwechslung des potentiell prooxidativen Häms zum antioxidativ wirksamen Bilirubin ; Review : Elbirt K.K., Bonkovsky H.L., 1999 ). Ihre

Funktionen unterscheiden sich dahingehend, welchen Aspekten von oxidativem Streß entgegengewirkt wird und auf welche Art und Weise dies geschieht.



**Abb. 7 :** Funktion verschiedener an der antioxidativen Antwort beteiligten Enzyme. Erklärung siehe Text.

Glutathion-S-Transferasen inaktivieren Elektrophile und ermöglichen deren Ausscheidung, indem deren elektrophiles Zentrum mit dem nukleophilen Glutathion konjugiert wird ( Review : Hayes J.D., Pulford D.J., 1995 ). NAD(P)H:Chinon Oxidoreduktasen beseitigen dahingegen durch eine 2-Elektronen-Reduktion die elektrophile Eigenschaft ihrer Substrate und entziehen diese zudem 1-Elektronen-Redoxzyklen, die zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen ( Review : Jaiswal A.K., 2000 ).

Wenn auch diese beiden Enzyme wohl die entscheidenden bei der Bekämpfung der meisten aufgrund ihrer Elektrophilität toxischen Verbindung sind, wird mit den katalysierten Umsetzungen in Verbindung mit chinoiden Fremdstoffen nicht unbedingt eine dauerhafte Entgiftung erreicht. Einerseits können die mit Glutathion konjugierten Chinone weiterhin an 1-Elektronen-Redoxzyklen teilhaben ( Wefers H., Sies H., 1983 ). Andererseits ist es möglich, daß die durch die NAD(P)H:Chinon Oxidoreduktase entstehenden Hydrochinone reoxidieren und so ein reaktive Sauerstoffspezies generierender 2-Elektronen-Redoxzyklus verursacht wird. Hier könnten die UDP-Glucuronosyltransferasen eine wichtige Funktion einnehmen. Sie konjugieren die durch die NQO1 reduzierten Chinone in einer Art und Weise, die eine weitere Beteiligung an Redoxreaktionen ausschließt. Wird die chinoide Struktur primär als Hydrochinon in die Zelle eingebracht oder metabolisch erzeugt, wird darüber hinaus durch die Konjugation mit Glucuronsäure die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies und Elektrophiler von vorneherein unterbunden.

An der Aufrechterhaltung der Glutathion-Konzentrationsverhältnisse ist eine Reihe nicht dem Fremdstoffmetabolismus zugeordneter Enzyme beteiligt. Der bei ausreichenden intrazellulären Cystein-Konzentrationen für eine Glutathion-Neusynthese Geschwindigkeits-bestimmende Schritt wird von der  $\gamma$ -Glutamylcystein Synthetase durchgeführt. Die Regulation dieses Enzyms ist damit in zweifacher Hinsicht an der chemopräventiven Wirkung monofunktionaler Induktoren beteiligt ( Review : Rahman I., MacNee W., 2000 ). So reagiert die Zelle auf den Einfluß solcher Wirkstoffe häufig im Sinne einer "vorsorglichen Überkompensation" mit einem längerfristig deutlich erhöhten Glutathion-Spiegel. Dieser führt wiederum zur vermehrten nicht-enzymatischen Inaktivierung reaktiver radikalischer und elektrophiler Verbindungen - ein Aspekt der "antioxidativen Antwort", der wesentlich zur Chemoprävention beitragen kann. Mit einer ausreichenden Bereitstellung des als Kosubstrat dienenden Glutathions

wird aber auch mittelbar die enzymatische Elimination reaktiver Sauerstoffspezies durch die Glutathion-Peroxidase und Elektrophiler durch Glutathion-S-Transferasen befördert.

## 1.4 Transkriptionelle Regulation von Genen durch monofunktionale Induktoren

### 1.4.1 Redox-Kontrolle der Transkription

Die monofunktionale Induktion findet, unabhängig von der Art der oxidativen Belastung und dem betrachteten Enzym, überwiegend auf transkriptioneller Ebene statt ( Primiano T. et al., 1997 ; Dalton T.P. et al., 1999 ). Dementsprechend dauert die auch aus kurzfristiger Einwirkung solcher Fremdstoffe resultierende Aktivierung im allgemeinen über Stunden bis Tage an, ein Umstand, der für die Chemoprävention von großem Vorteil ist.

Die transkriptionelle Regulation der Genexpression wird einerseits durch sogenannte 'Transkriptions-Faktoren' vermittelt, DNA-bindenden Proteinen, die über Änderungen in der DNA-Struktur oder Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, insbesondere generellen Transkriptionsfaktoren, befähigt sind, das Ausmaß der Transkription zu erhöhen ( 'Enhancer' ) oder zu erniedrigen ( 'Silencer' ). Diese Einflußnahme wird reguliert, indem "vorgeschaltete" Signalketten die im Kern verfügbare Menge des Faktors, die Stärke der DNA-Bindung oder die Fähigkeit zur Wechselwirkung mit anderen Faktoren ( 'Transaktivierung' ) modulieren.

Welche Gene durch bestimmte Faktoren kontrolliert werden, legen auf der anderen Seite die sogenannten 'Transkriptions-Elemente' fest, Abschnitte in den regulatorischen Sequenzen der Strukturgene, deren charakteristische Basen-Abfolge Voraussetzung ist, um zugehörige Faktoren zu binden.

Einige grundlegende Aspekte der Einflußnahme pro- und antioxidativer Verbindungen auf die transkriptionelle Regulation der Genexpression konnten in Verbindung mit den seit längerem gut charakterisierten Transkriptions-Faktoren der AP-1- und der NF $\kappa$ B-Familien geklärt werden ( Galter D. et al., 1994 ; Pinkus R. et al., 1996 ). Außerdem sind zumindest AP-1-Faktoren und -Elemente ( u.a. das 'TPA responsive element', 'TRE', auch AP-1-Element genannt ) auch an der monofunktionalen Induktion Fremdstoff-metabolisierender Enzyme beteiligt ( Review : Primiano T. et al., 1997 )

Transkriptions-Elemente beider Familien vermitteln in vivo als Antwort auf oxidative Einflüsse, insbesondere reaktive Sauerstoffspezies, meist eine Aktivierung der Genexpression ( AP-1, Review : Angel P., Karin M., 1991 ). Beteiligte Mechanismen sind unter anderem die transkriptionelle Regulation, die Phosphorylierung und die Translokation zugehöriger Transkriptions-Faktoren in Abhängigkeit oxidativer Signale.

Für eine maximale Wirkung muß auf der anderen Seite im Nukleus ein reduzierendes Milieu herrschen. Ursache dessen sind Cystein-Reste der beteiligten Transkriptionsfaktoren, deren reduzierter Status für die DNA-Bindung entscheidend ist. Diesen Status in vivo aufrechterhaltender Elektronendonator scheint Thioredoxin zu sein, vermittelt wird die Elektronen-Übertragung durch Ref-1, einem nur im Kern befindlichen und interessanterweise auch an DNA-Reparaturprozessen beteiligten Protein ( Hirota K. et al., 1997 ).

Zusammengefaßt scheinen die AP-1- und NF $\kappa$ B-Faktoren nicht generell über in ihnen enthaltene redoxensitive Reste reguliert zu werden. Vielmehr wirkt oxidativer Streß oft im nukleären Kompartiment über diesen Mechanismus inaktivierend, im cytosolischen Kompartiment auch über andere Wirkprinzipien dahingegen aktivierend. Diese "gegenläufige" Regulation kann als Schutzmechanismus interpretiert werden, der der Zelle nur dann die Mobilisierung

einer "antioxidativen Antwort" erlaubt, wenn die Redoxhomöostase im für die Transkription und die Replikation entscheidenden Kompartiment noch gewährleistet ist.

Des Weiteren wird anhand des TRE-Elements die Bedeutung mehrerer an das selbe Element bindender Faktoren ersichtlich. An dieses Element ( Kernsequenz 'TGACTCA' ) bindende Homodimere der Transkriptionsfaktoren-Familie Jun ( Jun/Jun ) haben ein eher geringes Transaktivierungs-Potential, Heterodimere mit c-Fos ( Jun/c-Fos ) sind dahingegen wesentlich aktiver. Heterodimere mit anderen Mitgliedern der Fos-Familie wiederum ( Jun/FosB, Jun/Fra1 ) besitzen überhaupt keine transaktivierenden Eigenschaften mehr ( Yoshioka K. et al., 1995 ).

Eine derartige Konstellation erlaubt es der Zelle, schon im Rahmen eines einzelnen Transkriptions-Elements den Zustand mehrerer Parameter ( "verschlüsselt" durch die absoluten und relativen Mengen an mehreren Faktoren ) für jedes Gen separat ( über unterschiedliche Bindungs-Präferenzen in den Elementen ) in ein bestimmtes Transaktivierungs-Ausmaß umzusetzen.

### 1.4.2 Das 'Antioxidant Response Element'

Beim sogenannten 'Antioxidant Response Element' ( 'ARE', im Sinne von "Element der antioxidativen Antwort" ; auch 'Electrophile Responsive Element', 'EpRe' ) handelt es um ein 1990 unabhängig voneinander in den regulatorischen Sequenzen der Ratten- und der Mäuse-GST entdecktes Element ( Rushmore T.H., Pickett C.B., 1990 ; Friling R.S. et al, 1990 ), das vermutlich bei der monofunktionalen Induktion Fremdstoff-metabolisierender Enzyme eine zentrale Rolle spielt. Es trägt außerdem häufig maßgeblich zur basalen Expression bei.

Die Kernsequenz umfaßt mindestens die Abfolge 'TGA(C/G/T)NNGC' ( Rushmore T.H. et al., 1991 ; Jaiswal A.K., 1994b ; Wang B., Williamson G., 1994 ; Favreau L.V., Pickett C.B., 1995 ; Wasserman W.W., Fahl W.E., 1997b ). Weitere für eine Bindung nukleärer Komplexe notwendige Voraussetzungen scheinen zu existieren ( Nguyen T. et al., 1994 ; Wasserman W.W., Fahl W.E., 1997a ), werden jedoch kontrovers diskutiert ( vgl. Jaiswal A.K., 1994a ; Xu X., Stambrook P.J., 1994 ; Itoh K. et al., 1997 ).

Auch unter Einbeziehung solcher weiterer Restriktionen verbleibt innerhalb der Kernsequenz ein großer Spielraum, der eine vollständige Überlappung mit Kernsequenzen anderer Elemente erlaubt. So ist z.B. in der ARE-Sequenz der NAD(P)H:Chinon Oxidoreduktase 1 des Menschen, 'TGACTCAGC', auch das TRE-Element vollständig erhalten. Auch das 'TRE-like MAF Recognition Element' ( 'T-MARE' ) mit der Basen-Abfolge 'TGCTGACTCAGCA' und die 'NF-E2 binding site', 'TGCTGACTCA', können sich mit der ARE-Sequenz überlappen.

Nichtsdestoweniger handelt es sich beim ARE um ein eigenes, von ähnlichen Elementen klar unterscheidbares Element. Für die Aktivierung durch monofunktionale Induktoren ist die abschließende 'GC-Box' entscheidend ( nicht Bestandteil des TREs und der NF-E2 binding site ) und die Einbettung eines TREs erhöht zwar die basale Expression, hat aber geringe oder sogar negative Auswirkungen auf das Ausmaß der Induktion ( Nguyen T. et al., 1994 ; Xie T. et al., 1995 ).

### 1.4.3 Die Transkriptionsfaktoren Nrf1 und Nrf2

Daß es sich beim ARE um ein "eigenständiges" Element handelt, konnte auch durch den Nachweis spezifisch bindender nukleärer Komplexe nachgewiesen werden. Diese unterschieden sich in der Größe beteiligter Proteine und dem Einfluß reduzierender Verbindungen, kompetierender Oligonukleotide und einzelner Basen-Mutationen von an ähnliche Ele-

mente bindenden Komplexen ( Wang B., Williamson G., 1994 ; Favreau L.V., Pickett C.B., 1995 ; Liu S., Pickett C.B., 1996 : YABP ; Wasserman W.W., Fahl W.E., 1997b : ARE-BP1 ; Wild A.C. et al., 1998 ). Sie konnten aber zunächst keiner bekannten Transkriptionsfaktor-Familie zugeordnet werden.

Eine spezifische Bindung der typischen AP-1-Komplexe, also Homodimere der Jun-Familie und Heterodimere mit c-Fos, wurde für das ARE der GST-Ya der Ratte und das der NQO1 der Ratte ausgeschlossen ( Nguyen T., Pickett C.B., 1992 ; Nguyen T. et al., 1994 ; Favreau L.V., Pickett C.B., 1993 ). Es fanden sich jedoch in der Folge vermehrt Hinweise darauf, daß - neben der Bindung solcher AP-1-Komplexe an benachbarte oder eingebettete TRE-Sequenzen ( Friling R.S. et al., 1992 ) - Transkriptions-Faktoren der Jun und Fos-Familie auch an spezifisch das ARE bindenden Komplexen beteiligt sein können ( Li Y., Jaiswal A.K., 1992a ; Li Y., Jaiswal A.K., 1992b ; Li Y., Jaiswal A.K., 1994 ).

Angeregt durch den Nachweis der Bindung sogenannter 'kleiner Maf-Proteine' an das ARE der regulatorischen Sequenzen verschiedener NQO1- und GST-Gene ( Kerppola T.K., Curran T., 1994 ) und dem Umstand, daß diese Transkriptionsfaktoren mit solchen der NF-E2-Familie ( u.a. Nrf1 und Nrf2, Moi P. et al., 1994 ) heterodimerisieren ( Andrews N.C. et al., 1993 ), konnte schließlich die Beteiligung von Nrf1 und Nrf2 an nukleären Komplexen und ihre vorherrschende Rolle bei der Vermittlung monofunktionaler Induktion durch das ARE der menschlichen NQO1 nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde ein negativ regulierender Einfluß der Faktoren Fra1 und c-Fos gezeigt ( Venugopal R., Jaiswal A.K., 1996 ). Die maßgebliche Beteiligung von Nrf2 an der positiven Regulation Fremdstoff-metabolisierender Enzyme wurde anhand Nrf2-(-/-)-'knockout'-Mäusen auch *in vivo* bestätigt. Die mRNA-Spiegel nahezu aller untersuchten GST-Isoformen und der NQO1 waren im Gegensatz zu heterozygoten Tieren deutlich weniger induzierbar. Außerdem konnte die spezifische Bindung des ARE der Mäuse-GST-Ya durch Nrf2/MafK-Heterodimere gezeigt werden ( Itoh K. et al., 1997 ).

Schließlich konnte der spezifisch an das ARE der menschlichen NQO1 und der GST-Ya der Ratte bindende Komplex als Nrf1/c-Jun- bzw. Nrf2/c-Jun-Heterodimer identifiziert werden. Wieder erwies sich Nrf1 und Nrf2 als positiv regulierend, wobei beide Faktoren um die Bindung an gleiche Elemente und Komplex-Partner kompetierten und Nrf2 das höhere Transaktivierungspotential besaß. Bis zu einem bestimmten c-Jun/Nrf-Mengenverhältnis wirkte auch c-Jun positiv regulierend, höhere Anteile führten dahingegen zu einer Repression ( Venugopal R., Jaiswal A.K., 1998 ). In weiteren Untersuchungen konnten die Gültigkeit der Ergebnisse für Nrf1, Nrf2 und c-Jun auch auf das ARE der katalytischen GCS-Untereinheit des Menschen ausgedehnt ( Jeyapaul J., Jaiswal A.K., 2000 ) und 'kleinen Maf-Proteinen' eine negativ regulierende Rolle zugeordnet werden ( Wild A.C. et al., 1999 ; Nguyen T. et al., 2000 ; Dhakshinamoorthy S., Jaiswal A.K., 2000 ).

Insgesamt scheinen meist die ( nicht zur Homodimerisierung fähigen ) Transkriptionsfaktoren Nrf1 und Nrf2 in Komplexen mit AP-1-Faktoren oder kleinen Maf-Proteinen für die ARE-vermittelte Regulation der Genexpression verantwortlich zu sein, wobei vermutlich Nrf2 eine zentrale Funktion bei der Übertragung der Signale monofunktionaler Induktoren einnimmt. Andere bisher nachgewiesene Wechselwirkungen des ARE, z.B. die mit Östrogen-Rezeptoren ( Montano M.M. et al., 1998 ) und dem Ah-Rezeptor ( Vasiliou V. et al., 1995 ), dürften eine eher untergeordnete Rolle spielen.

Ein an der Signal-Weiterleitung durch Nrf2 beteiligter Mechanismus ist die Freisetzung und Translokation in den Nukleus des im nicht induzierten Zustand über den Bindungspartner Keap1 mit Bestandteilen des Cytoskeletts assoziierten Transkriptions-Faktors ( Itoh K., et al., 1999 ). Diese Freisetzung scheint jedoch nicht der einzige Mechanismus der Signal-Übertragung zu sein. Komplexe von *in vitro* translatiertem Nrf2 und c-Jun müssen zunächst von

cytosolischen Faktoren modifiziert werden, um an das ARE binden zu können ( Venugopal R., Jaiswal A.K., 1996 ). Kürzlich konnte nachgewiesen werden, daß Nrf2 - aktivierbar durch monofunktionale Induktoren - von der ProteinKinase C phosphoryliert wird ( Huang H.C. et al., 2000 ). Es bleibt indessen unklar, welchen Stellenwert die Phosphorylierung durch diese Kinase bei der posttranslationalen Modifikation von Nrf2 einnimmt. Auch die MAP-Kinasen-abhängigen Signalkaskaden der JNKs ( 'c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases', auch 'stress-activated protein kinases' ), der ERKs ( 'extracellular signal-regulated kinases' ) und der p38-MAP-Kinasen ( Yu R. et al., 2000 ) scheinen in die über das ARE vermittelte Regulation der Genexpression involviert zu sein.

## **1.4.4 Transkriptionelle Regulation verschiedener Enzyme der antioxidativen Antwort**

### **1.4.4.1 Glutathion-S-Transferasen**

Das ARE wurde als eigenständiges Element zunächst in der GST-Isoform Ya ( nach heutiger Nomenklatur GST A1/2 ) der Ratte ( Rushmore T.H. et al., 1990 ) und der Maus ( Friling R.S. et al., 1990 ) identifiziert. Es konnte gezeigt werden, daß dieses Element hauptverantwortlich für die transkriptionelle Regulation dieser Isoform durch monofunktionale Induktoren ist ( Rushmore T.H., Pickett C.B., 1990 ; Friling R.S. et al., 1990 ). Auch in den regulatorischen Sequenzen der GST-P der Ratte und der Maus scheint ein ARE maßgeblich zu sein ( Okuda A. et al., 1987 ). Indessen lassen sich die für Nager erhaltenen Ergebnisse kaum auf den Mensch übertragen. Von den menschlichen GST-Klassen GST $\alpha$ ,  $\mu$  und  $\pi$  läßt sich nur erstere und dies nur schwach durch entsprechende Substanzen induzieren ( Morel F. et al., 1993 ). Eine Untersuchung der Isoformen A1 und A2 zeigte außerdem, daß deren regulatorische Sequenzen weder mit der Ratten-Isoform Ya vergleichbare Transkriptions-Elemente enthalten noch auf die Anwesenheit monofunktionaler Induktoren ansprechen ( Suzuki T. et al., 1994 ).

### **1.4.4.2 NAD(P)H:Chinon Oxidoreduktasen**

Das zunächst in der NQO1 der Ratte nachgewiesene ARE ist ebenfalls das für die monofunktionale Induktion entscheidende Element ( Favreau L.V., Pickett C.B., 1991 ). Darüber hinaus scheint auch die diesbezügliche Regulation der menschlichen NQO1-Isoform sehr ähnlich abzulaufen - ein ARE mit nahezu der selben Sequenz spielt für die monofunktionale Induktion ebenfalls die dominante Rolle ( Jaiswal A.K., 1991 ). Allerdings ist im Gegensatz zur Ratte in das ARE der menschlichen NQO1 ein TRE "eingebettet" .

### **1.4.4.3 $\gamma$ -Glutamylcystein Synthetasen**

Die  $\gamma$ -Glutamylcystein Synthetase ist ein aus einer 'schweren' katalytischen ( GCS<sub>h</sub> ) und einer 'leichten' regulatorischen ( GCS<sub>l</sub> ) Untereinheit bestehendes Heterodimer, deren Aktivierung durch monofunktionale Induktoren und oxidativen Streß nicht ausschließlich, aber zu einem wesentlichen Teil auf transkriptioneller Ebene abläuft. Diese wurde im Falle der katalytischen Untereinheit des Menschen einerseits allein auf ein distales ARE mit einem eingeschlossenen und einem benachbarten TRE zurückgeführt ( Mulcahy R.T. et al., 1997 ; Wild A.C. et al., 1998 ), in anderem Kontext ( Zelltyp, Induktor ) kann auch ein proximales TRE beteiligt sein ( Rahman I. et al., 1998 ). Die Ergebnisse für die transkriptionelle Aktivierung

der regulatorischen Untereinheit ( Galloway D.C., et al., 1997 ) sind widersprüchlich ( trotz gleichem Zelltyp und Induktor ), einerseits wurde ein einzelnes TRE als verantwortlich identifiziert ( Galloway D.C., McLellan L.I., 1998 ). Andere Ergebnisse legen die maßgebliche Beteiligung eines benachbarten ARE mit eingebettetem TRE nahe ( Moinova H.R., Mulcahy R.T., 1998 ).

#### 1.4.4.4 UDP-Glucuronosyltransferasen

Mit der erste Hinweis auf eine Beteiligung Fremdstoff-metabolisierender Enzyme an der Chemoprävention war der Nachweis einer erhöhten Ausscheidung von Glucuronid-Konjugaten von Acetylaminofluoren ( einem Kanzerogen ) bei Ratten, deren Nahrung mit Butylhydroxyanisol versetzt war ( Grantham P.H. et al., 1973 ). Es wurde im weiteren gezeigt, daß tatsächlich die UGT-Aktivität in der Rattenleber durch den monofunktionalen Induktor Ethoxyquin erhöht wird ( Bock K.W. et al., 1980 ). Über den monofunktionalen Mechanismus wirkende Substanzen induzieren den mRNA-Spiegel der UGT1A6 in der Rattenleber mehr, als die aller anderen untersuchten Phase-II-Enzyme ( Buetler T.M. et al., 1995 ). In Nrf2-(-/-)-'knockout'-Mäusen ließ sich schließlich eine deutliche Erniedrigung der basalen Expression der UGT1A6 im Lungengewebe ( stärker als z.B. bei der GCSI, der HO-1 und der NQO1 ; Chan K., Kan Y.W., 1999 ) und eine Beeinträchtigung der Induzierbarkeit in der Leber nachweisen ( Ramos-Gomez M. et al., 2001 ). Eine weitere Eingrenzung beteiligter Regulations-Mechanismen konnte bis heute nicht erfolgen.

Auch beim Menschen werden verschiedene UGT-Isoformen, darunter auch die UGT1A6, monofunktional induziert ( Münzel P.A. et al., 1999 ), ohne daß die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen klar wären. Die auf eine einheitliche elementare Aufgabe hinweisende Verwandtschafts-Analyse der Isoform UGT1A6 ( vgl. Abb. 2 ) legt allerdings nahe, daß zumindest bei dieser Isoform eine dem Mäuse-Isoschizomer entsprechende, Nrf2-vermittelte Signalübertragung beteiligt ist.

## 1.5 Die Caco-2-Zelllinie

Die aus dem Colonkarzinom eines 72-jährigen Patienten etablierte Zelllinie 'Caco-2' ( Fogh et al., 1977a ; Fogh et al. 1977b ) wurde seit der Entdeckung ihrer Differenzierungs-Eigenschaften ( Pinto M. et al., 1983 ) zur Beantwortung verschiedenster Fragestellungen als 'in-vitro'-Modell für reife Enterocyten des Dünndarms eingesetzt. Konfluente Zellkulturen weisen sowohl die morphologischen als auch die meisten funktionellen Merkmale des 'in-vivo'-Zelltyps auf. So bildet sich z.B. ein Bürstensaum, und Enzyme und Transporter zeigen die typische, polarisierte Verteilung. Als für maligne Zelltypen charakteristische Merkmale weisen Caco-2-Zellen einen ungewöhnlich hohen Glucose-Verbrauch und eine mit Leberzellen vergleichbare Glykogen-Einlagerung auf.

Aus der Stammlinie wurden eine Reihe von Klonen isoliert, die sich in Details bezüglich des Glucose- und Fremdstoffmetabolismus unterscheiden ( Chantret I. et al., 1994 ; Caro I. et al., 1995 ). Im Rahmen dieser Arbeit setzte man den 'TC7'-Klon ein, der in Hinsicht auf den Fremdstoff-Metabolismus aufgrund der Exprimierung der maßgeblichen Enzyme bereits des öfteren als geeignetes Modell erachtet wurde ( Caro I. et al., 1995 ; Carriere V. et al., 1996 ; Münzel P.A. et al., 1999 ).

Die Klone TC7, PD7 und PF11 wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Alain Zweibaum ( INSERUM U-178, 94807 Villejuif, Frankreich ) zur Verfügung gestellt.

## 1.6 Fragestellung

Die UDP-Glucuronosyltransferasen ( UGTs ) spielen beim Menschen eine vorherrschende Rolle in der Phase-II des Fremdstoffmetabolismus. Sie werden bekanntermaßen sowohl durch endogene als auch Umweltfaktoren reguliert. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß eine der menschlichen Isoformen der UGT-Familie, die humane UGT1A6, im Caco-2-Modellsystem durch *tert*-Butylhydrochinon ( TBHQ ) induziert werden kann ( Münzel P.A. et al, 1999 ).

TBHQ wurde in Nagern als Prototyp einer Reihe verschiedenartiger, meist aber elektrophiler Substanzen charakterisiert, den sogenannten 'monofunktionalen Induktoren' oder auch 'Induktoren vom Antioxidantientyp'. Diese lösen eine eigene, erst kürzlich charakterisierte Signalkette aus. Es wird davon ausgegangen, daß aufgrund dieser Signalkette gegenüber subtoxischen Dosen exponierte Zellen verstärkt protektive Enzyme der Phase-II des Fremdstoffmetabolismus exprimieren und damit eine erhöhte Resistenz gegenüber der Toxizität dieser Stoffe erlangen. Es wird weiterhin angenommen, daß die UGT1A6 der Nager und des Menschen ein Teil dieser gemeinsam gesteuerten Gen-Batterie ist. So weist unter den in der Ratte untersuchten Phase-II-Enzymen die UGT1A6 mit die höchste Induzierbarkeit durch monofunktionale Induktoren auf ( Buetler T.M. et al., 1995 ).

Über den Mechanismus der Induktion der UGTs durch TBHQ ist indessen bisher wenig bekannt. Es sollte deshalb versucht werden, diesen Mechanismus näher zu untersuchen.

Auf Grundlage des TBHQ-induzierbaren Modellsystems der Caco-2/TC7-Zelle ( Münzel P.A., 1999 ) und den zur Verfügung stehenden ( Ritter J.K. et al., 1992 ) und sequenzierten ( Münzel P.A. et al., 1998 ) 3 kb der 5'-terminalen Region des Promotors der UGT1A6 sollten im einzelnen :

- 1.) potentiell an einer monofunktionalen Induktion der UGT1A6 beteiligte Transkriptions-Elemente identifiziert werden.
- 2.) geprüft werden, ob die zuvor nachgewiesene Erhöhung des mRNA-Spiegels der menschlichen UGT1A6 durch monofunktionale Induktoren Folge einer transkriptionellen Aktivierung ist.
- 3.) bei Bestätigung einer transkriptionellen Aktivierung verantwortliche Bereiche eingegrenzt werden.
- 4.) bei Hinweisen auf Beteiligung eines ARE oder ARE-ähnlichen Motivs bindende Transkriptions-Faktoren identifiziert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Allgemein benötigtes Material

Spezifisch für eine Methode eingesetzte Geräte, Verbrauchsmaterialien, Puffer und Lösungen sind dort aufgeführt. Chemikalien ohne ausdrücklich aufgeführte Herstellerangaben wurden von Merck, Darmstadt, bezogen.

**Geräte :** Ultrazentrifuge Beckman Model J2-21 ( Rotor JA-20 ) : Beckman, München ; Schwenkrotor-Zentrifuge Megafuge 1.0R ( Rotor BS 4402/A ) : Heraeus Instruments, Hanau ; Eppendorf-Zentrifuge Centrifuge 5410 : Eppendorf, Engelsdorf ; Eppendorf-Kühlzentrifuge MikroRapid/K : Hettich, Tuttlingen ; PCR-Thermocycler : GeneAmp 2400, Perkin-Elmer, Überlingen ; Wasserbad 'Thermocycler 60 Biomed' : Bachofer, Reutlingen ; Thermomixer 5436 : Eppendorf, Engelsdorf ; Photometer Shimadzu UV 160-A, Shimadzu, Düsseldorf ; Mikroquarzküvette 105.202-QS : Hellma .

**Verbrauchsmaterial :** 1ml-Einmal-Küvette 67.742 : Sarstedt AG, Nümbrecht ; PCR-Reaktionsgefäße 0,2ml 'M $\mu$ lti' : AGS GmbH, Heidelberg ; 15ml- bzw. 50ml-Zentrifugenröhrchen Falcon 352096 bzw. 352070 : Becton Dickinson, Heidelberg ; 50ml-Ultrazentrifugenröhrchen ( für Rotor JA-20 ) Polyallomer 357001 : Beckman, München ; 10ml- ( 'Inject', 'Luer'-Verschluß ) / 50ml- ( 'Luer-Lok'-Verschluß ) Einmalspritzen : B.Braun Melsungen AG, Melsungen ; Sterilfilter-Spritzenaufsatz 0,22 $\mu$ m : Sartorius AG, Göttingen .

#### Puffer, Lösungen

	Komponente	Konzentr.	Bemerkung
SDS-Lösung	SDS	20 %	200g / 1,0l
EDTA-Lösung	EDTA NaOH	0,25 M pH 8,0	9,31g / 100ml bei 372,24 g/mol
PBS-Puffer	NaCl KCl NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> NaOH	110 mM 4,0 mM 25 mM pH 7,4	6,43g / 1,0l bei 58,44 g/mol 298mg / 1,0l bei 74,56 g/mol 3,45g / 1,0l bei 138,0 g/mol
TE-Puffer pH 8,0	Tris EDTA HCl	10 mM 1,0 mM pH 8,0	121mg / 100ml bei 121,1 g/mol 400 $\mu$ l 0,25M EDTA-Lsg. / 100ml

SDS = 'Sodiumdodecylsulfate' ( Natriumlaurylsulfat ) ; EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure ( Dinatriumsalz Dihydrat ) ; Tris = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan .

## 2.2 Zellkulturen

### 2.2.1 Allgemeines

#### 2.2.1.1 Material

**Geräte :** Brutschrank : 'BB 6220 C', Heraeus Instruments, Hanau ; Sterilbank : UVF 6.12 S, BDK, Sonnenbühl-Genkingen ; Mikroskop : Laborvert, Leitz, Wetzlar ; Fuchs-Rosenthal-Zählkammern : Brand, Wertheim .

**Verbrauchsmaterial :** 10cm-Zellkulturschalen Falcon 353003 : Becton Dickinson, Heidelberg ; Medien-Sterilfilter 'VacuTop CA-Membran' 0,2  $\mu$ m : MembraPure, Bodenheim ;

0,9mm-Einmal-Injektionskanülen ( 'Sterican' Größe 1 ) : B.Braun Melsungen AG, Melsungen ; Kryo-Röhrchen 'Cryotube' : Nalge Nunc International Corp., Naperville ( USA ) .

**Lösungen, Medien** : '10×Trypsin/EDTA'-Lösung : Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein ; Fötale Kälber Serum ( FKS ) : Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein ; Dimethylsulfoxid ( DMSO ) ;

Induktoren : *tert*-Butylhydrochinon,  $\beta$ -Naphthoflavon : Sigma-Aldrich, St.Louis ( USA ) .

### 2.2.1.2 Medien-Herstellung und -Lagerung, Medienwechsel

Die Zellkulturmedien wurden entsprechend der Hersteller-Vorschriften hergestellt, sterilfiltriert und luftdicht verschlossen in Flaschen bei 2 - 4°C gelagert. Antibakterielle Zusätze wurden nicht verwendet. Für Medienwechsel wurde das benötigte Volumen in Erlenmeyer-Kolben gefüllt, mindestens 30 min im Brutschrank bezüglich Temperatur und CO<sub>2</sub>-Gehalt äquilibriert und erst dann eingesetzt.

Auf diese Weise konnten einerseits durch wiederholtes Erwärmen einsetzende Zersetzungsprozesse im Kulturmedium ( insbesondere Glutamin-Hydrolyse ), andererseits durch Temperatur- bzw. pH-Wert-Sprünge ( das offene CO<sub>2</sub>-Puffersystem von Kulturmedien weist bei Verlust des gelösten CO<sub>2</sub>-Gases äußerst hohe pH-Werte auf ) verursachte Streß-Reaktionen der Zellkulturen auf ein Mindestmaß beschränkt werden.

Vor Benutzung von Sterilfiltern wurde grundsätzlich mit H<sub>2</sub>O<sub>bide</sub>st gespült, um eventuell vorhandenes pyrogenes Material auszuwaschen.

### 2.2.1.3 Auftauen

Das entsprechende Zellmaterial wurde dem Stickstofftank entnommen, das Kryoröhrchen von außen mit reichlich 70%-igem Ethanol desinfiziert, geöffnet und durch Handwärme zügig aufgetaut. Sobald sich die teilweise noch gefrorene Zellsuspension vom Boden des Kryoröhrchen lösen ließ, wurde diese in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen mit 30 ml eiskaltem Kulturmedium gekippt, kurz aufgeschlämmt ( schnellstmögliche Verdünnung der im Einfriermedium enthaltenen, toxischen DMSO-Konzentration ) und sofort 5 min bei 300×g zentrifugiert. Den Überstand saugte man ab, suspendierte das Zellpellet in 12 ml Temperatur- und CO<sub>2</sub>-Gehalt-äquilibriertem Kulturmedium und gab davon 6, 3, 1,5, 0,75 und 0,4 ml in jeweils auf die mit 10 ml Kulturmedium befüllten, vorinkubierten 10cm-Kulturschalen. Die Zellkulturen wurden dann in den Brutschrank gegeben, nach 20 min nochmals aufgeschlämmt ( Konvektionsströmungen können sonst zu einer ungleichmäßigen Verteilung des Zellmaterials führen ) und der erste Medienwechsel nach 2 Tagen durchgeführt.

### 2.2.1.4 Passagierung

50 ml 10×Trypsin-Stammlösung wurden aufgetaut, in 12,5ml-Aliquoten in 50ml-Zentrifugenröhrchen abgefüllt und sofort wieder bei -20°C eingefroren oder weiterverarbeitet ( Trypsin-Lösungen neigen zum Selbstverdau ). Die 12,5ml-Aliquote füllte man dann mit 37,5 ml PBS-Puffer ( pH 7,4 ) zu einer 2,5×Trypsin-Lösung auf ( für eine definierte Wirksamkeit muß Trypsin in einem Puffer mit geeignetem pH-Wert und geeigneter Salzkonzentration gelöst werden ), und lagerte diese in 3,1ml-Portionen in 15ml-Zentrifugenröhrchen ebenfalls bei -20°C ein.

Für die Passagierung wurde dann ein 3,1ml-Aliquot im 37°C-Wasserbad 10 min aufgetaut, von einer am Vortag konfluent gewordenen Zellkultur das Medium gründlich abgesaugt, die 2,5×Trypsin-Lösung aufgetragen und die Kulturschale dann im Brutschrank inkubiert. Nachdem man durch kräftige seitliche Stöße noch am Kulturschalenboden haftenden Zellrasen gelöst hatte, wurde nach 7 - 7,5 min Inkubationszeit das Trypsin durch Zugabe von ca. 3 ml äquilibriertem Kulturmedium inaktiviert und die Zellen vereinzelt, indem die Suspension durch eine 0,9mm-Kanüle mit Hilfe einer geeigneten Spritze aufgesaugt und ausgestoßen

wurde ( ca. 4 Sekunden pro Aufsaug- bzw. Ausstoß-Hub ). Die erhaltene Suspension gab man nun in ein geeignetes Volumen an äquilibriumtem Medium und überführte jeweils nach gründlichem Aufschlännen Aliquote auf Zählkammern. Während des Auszählens wurde das Zellmaterial wieder in den Brutschrank gegeben.

Nach der Bestimmung der Zelldichte wurden entsprechende Volumina der Suspension in vorinkubierte, mit jeweils 10 ml Kulturmedium beschickte Kulturschalen gegeben, 20 min im Brutschrank Temperatur-äquilibriumtem, nochmals aufgeschlännt ( Vermeidung von durch Konvektionsströmungen hervorgerufene uneinheitlichen Zelldichten, s.o. ) und für 2 Tage im Brutschrank belassen.

Die Berechnung der Volumendichte der Zellsuspension erfolgte nach :

Volumendichte = durchschnittliche Zellzahl pro Kleinquadrat ÷ Volumen pro Kleinquadrat, mit 0,0002 ml pro Kleinquadrat bei der eingesetzten Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ( 16 Kleinquadratrate pro Zählkammer, 16 Kleinstquadrate pro Kleinquadrat ).

Die Berechnung des aufzutragenden Suspensions-Volumens nach :

Suspensions-Volumen = gewünschte Flächendichte × Kulturschalen-Fläche ÷ Volumendichte.

### 2.2.1.5 Einfrieren

Die Zellkulturen wurden zunächst in der bereits beschriebenen Art und Weise trypsiniert. Die Inaktivierung durch 3 ml vorinkubiertes Medium erfolgte jedoch bereits nach 5 min und statt die Zellen zu vereinzeln, löste man lediglich durch wiederholtes Aufsaugen und Ausstoßen mit einer 5ml-Pipette den Zellrasen vom Kulturboden. Das erhaltene Zellmaterial wurde in 100 ml äquilibriumtem Kulturmedium gesammelt und zwischenzeitlich sowie nach Erhalt des letzten Zellmaterials weitere 30 min im Brutschrank inkubiert ( Erholungsphase ).

Danach zentrifugierte man die Suspension in zwei 50ml-Zentrifugenröhrchen 7 min bei 4°C und 300g, saugte den Überstand ab und stellte das Zellpellet auf Eis. Die Zellen wurden nun schnellstmöglich mit Hilfe von vorgekühlten Pipetten in 2 ml eiskaltem Einfriermedium pro Kulturschale suspendiert, in 0,5ml-Portionen in ebenfalls vorgekühlte Kryoröhrchen gefüllt und in einem Styroporbehältnis in eine -70°C-Kühleinheit gegeben. Nach ca. 8 Stunden lagerte man die erhaltenen Dauerkulturen über flüssigem Stickstoff ein.

### 2.2.1.6 Behandlung

Als Lösungsvermittler für die verwendeten Wirkstoffe wurde DMSO verwendet ( Stamm-lösung *tert*-Butylhydrochinon 400 bzw. 200 mM, 66,5 bzw. 33,2 mg/ml bei 166,2 g/mol, 1:5000 bzw. 1:2500 im Kulturmedium verdünnt,  $\beta$ -Naphthoflavon 125 mM, 34,0 mg/ml bei 272,3 g/mol, 1:2500 verdünnt ). Um der Möglichkeit der Autooxidation redoxaktiver Wirkstoffe entgegenzuwirken, fror man hergestellte Stammlösungen sofort in Aliquoten bei -20°C ein und verwarf diese nach einmaliger Verwendung.

Um eine einheitliche Behandlung zu gewährleisten, wurden Zusätze grundsätzlich den für das jeweilige Experiment benötigten vorinkubierten Gesamtvolumina an Kulturmedium zugegeben, gründlich gemischt und dann auf die einzelnen Kulturschalen verteilt.

## 2.2.2 Zellkultur-Spezifisches

### 2.2.2.1 Hepa1c1c7

<b>Kulturmedium</b>	90 %	$\alpha$ MEM ohne Ribo- und Desoxyribonukleoside ( Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein ) ; unter Zugabe von 2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> und pH-Äquilibriumtemierung mit HCl auf 7,2 ; sterilfiltriert durch 0,2 $\mu$ m-Membran .
	10 %	Aktivkohle-gereinigtes FKS ; 90 min mit 1g grobkörniger Aktivkohle ( Sigma-Aldrich, St.Louis USA ) zur Gasreinigung pro 100 ml bei 55°C inkubiert und dann 2 Mal durch 0,2 $\mu$ m-Membran sterilfiltriert .

**Einfriermedium**      40 % aMEM ( wie oben )  
                              50 % FKS  
                              10 % DMSO

**Kultivierungs-Bedingungen und -Parameter** : 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchte ;  
 Konfluenz 200.000 Zellen/cm<sup>2</sup>, 1 Woche präkonfluent 20.000 Zellen/cm<sup>2</sup> .

### 2.2.2.2 HepG2

**Kulturmedium**        90 % Eagle's MEM inklusive non-essential amino acids, sodium pyruvate and  
                                  Earle's BSS ( Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein )  
                              10 % FKS

**Kultivierungs-Bedingungen** : 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchte .

**Kultivierungs-Parameter** :

Tage bis zur Konfluenz	0	4	5	6	7	10
Flächendichte [ Zellen/cm <sup>2</sup> ]	600.000	330.000	180.000	100.000	60.000	10.000

### 2.2.2.3 Caco-2

**Kulturmedium**        80 % DMEM inklusive 4,5g/l Glucose, ohne Pyruvat ( Biochrom, Berlin ) ; unter  
                                  Zugabe von 3,5 g/l NaHCO<sub>3</sub> und pH-Äquilibrierung mit HCl auf 7,2 ; sterilfil-  
                                  triert durch 0,2µm-Membran .  
                              20% Hitze-inaktiviertes FKS : 500ml-Packungseinheit im 56°C Wasserbad aufge-  
                                  tauet und dort weitere 50 min belassen .  
                              1× 100×Non-Essential Aminoacids ( Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein )

**Einfriermedium**    88 % Hitze-inaktiviertes FKS ( s.o. )  
                              12 % DMSO

**Kultivierungs-Bedingungen** : 37°C, 10% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchte .

**Kultivierungs-Parameter** :

Tage bis zur Konfluenz	0	1	2	3	4	5	6	7
Flächendichte [ Zellen/cm <sup>2</sup> ]	60.000	40.000	27.000	18.000	12.000	8.000	5.600	3.600

## 2.3 Enzymaktivitäts-Bestimmungen

### 2.3.1 Herstellung der Zellhomogenate

Die für die in folgenden Abschnitten beschriebenen Enzymtests zur Bestimmung der Chinon-  
 reductase- und der UDP-Glucuronosyltransferase-Aktivität benötigten Zellhomogenate wur-  
 den mit Hilfe von Ultraschall hergestellt. Die Methode führt bei beiden Enzymtest zu höheren  
 und reproduzierbareren Aktivitäten als der Aufschluß mittels "Pottern" ( Daten nicht gezeigt ).

**Geräte** : Ultraschall-Gerät 'LabSonic 2000' : B.Braun Melsungen AG, Melsungen

**Lösungen** :

	Komponente	Konzentr.	Bemerkung
Tris-Sucrose-Lösung	D(+)-Saccharose	250 mM	85,6g / 1,0l bei 342,3 g/mol
	Tris	10 mM	1,21g / 1,0l bei 121,1 g/mol
	HCl	pH 7,4	

## Arbeitsprotokoll

Die Zellkulturen wurden 3 Mal mit eiskalter 0,9%-iger NaCl-Lösung gewaschen, mit Hilfe eines Zellkultur-Schabers vom Kulturboden gelöst und mit 5-10ml PBS-Puffer in 15ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen pelletierte man dann durch 6-minütige Zentrifugation bei  $300 \times g$  ( 1400rpm bei 14,5cm ) und  $4^\circ\text{C}$  und saugte den Überstand ab. Das erhaltene Pellet - das ggf. zwischenzeitlich bei  $-70^\circ\text{C}$  eingelagert wurde - überführte man nun mit einem geeigneten Volumen an Sucrose-Lösung ( 200-1000 $\mu\text{l}$  ) in Eppendorfcups und suspendierte die Zellen durch Trituieren. Die Suspension wurde dann - auf Eis und mit 15-sekündigen Pausen - 3 Mal 5 Sekunden bei einer Leistungsabgabe von 40 mW mit Ultraschall behandelt.

### 2.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Protein-Konzentrationen der Homogenate wurde nach Lowry photometrisch bestimmt ( Lowry O.H. et al., 1951 ; modifiziert ).

**Material :** Folin-Ciocalteus Phenolreagenz

**Arbeitsprotokoll :** Die Proben wurden in Eppendorfcups vorgelegt, mit Wasser auf 100 $\mu\text{l}$  aufgefüllt, mit 100 $\mu\text{l}$  1M NaOH-Lösung und dann mit 1,0ml Lowry-Lösung A ( 980ml 2%-ige  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -, 10ml 2,7%-ige K,Na-Tartrat-Tetrahydrat- und 10ml 1%-ige  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ -Lösung in angegebener Reihenfolge mischen ) versetzt und 10 min bei ca.  $20^\circ\text{C}$  inkubiert. Dann versetzte man mit 100 $\mu\text{l}$  Lowry-Lösung B ( 50ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz auf 100ml verdünnt ), mischte sofort gründlich ( es findet eine Umpufferung ins Saure statt, die möglichst schnell ablaufen sollte ), inkubierte weitere 30 min und maß schließlich die Absorption bei 720nm.

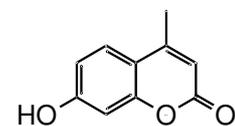
**Auswertung :** Der Proportionalitätsfaktor der Messung wurde mit Hilfe einer Eichgeraden bestimmt ( gültig für die Reagenzlösungen, die man jeweils in für einen längeren Zeitraum ausreichende Mengen herstellte ). Zum Zeitpunkt der Enzymaktivitäts-Bestimmungen ergab sich die Proteinkonzentration ( mit  $\Delta A$  : Absorption nach Abzug des durchschnittlichen Blindwerts ) nach :

$$\text{Protein-Konzentration} = 70 \text{ mgProtein/ml} \times \frac{\Delta A_{720\text{nm}} / [ \text{OD} ]}{\text{Volumen( Probe )} / [ \mu\text{l} ]}$$

### 2.3.3 UDP-Glucuronosyltransferase-Enzymtest

Beim hier beschriebenen UDP-Glucuronosyltransferase-Enzymtest ( Bock K.W., White I.N., 1974 ; Lilienblum W. et al., 1982 ; Hallinam T., 1983 ) handelt es sich um einen gestoppten Test. Das hydrophobe 4-Methylumbelliferon ( MUF ; Abb. 8 ) wird durch die Aktivität der UDP-Glucuronosyltransferase zu einem hydrophilen Konjugat umgesetzt. Nach dem Stoppen der Enzymreaktion wird das glucuronidierte Produkt durch eine Phasenextraktion vom Substrat abgetrennt und dessen Fluoreszenz gemessen.

Bei der Messung der UDP-Glucuronosyltransferase-Aktivität in bestimmten Geweben und Zellkulturen ist für das Erreichen der maximale Reaktionsgeschwindigkeit die Zugabe einer gewissen Menge Detergenz notwendig ( sogenannte 'Latenz' ). In Verbindung mit der Caco-2/TC7-Zelllinie ist dies nicht der Fall.



**Abb. 8 :** 4-Methylumbelliferon

**Geräte :** Fluoreszenz Spektrometer 'LS 5B' : Perkin-Elmer, Überlingen

**Lösungen, Puffer**

	Komponente	Konzentr.	Bemerkung
TrisHCl-Puffer, pH7,4	Tris HCl	1,0 M pH 7,4	12,1g / 100ml bei 121,1 g/mol ; 2000 Ansätze
MgCl <sub>2</sub> -Lösung	MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	50 mM	1,02g / 100ml bei 203,3 g/mol ; 2000 Ansätze
MUF-Lösung	4-Methylumbelliferon	5,0 mM	9,7mg / 10ml bei 194,2 g/mol ; in DMSO
UDPGA-Lösung	UDP- $\alpha$ -D-Glucuronid	30 mM	189mg / 10ml bei 631,4 g/mol ( Triammoniumsalz )
HClO <sub>4</sub> -Lösung	HClO <sub>4</sub>	500 mM	22,4ml Perchlorsäure 20% / 100ml bei 100,5 g/mol und 1,12 g/ml
Chloroform			( 400 ml für 200 Ansätze )
Glycin-NaOH-P.	Glycin NaOH	1,6 M pH 10,3	12,0g / 100ml bei 75,07 g/mol ( fest )

Soweit nicht anders vermerkt, reichen die Lösungen für ca. 200 Einzelansätze ; 4-Methylumbelliferon ( MUF ) : Sigma-Aldrich, St.Louis USA ; UDP- $\alpha$ -D-Glucuronid ( UDPGA ) : Roche Molecular Biochemicals, Mannheim .

**Arbeitsprotokoll**

Arbeitsschritt	Komponente	Stamm-Konzentr.	End-Konzentr.	Volumen	Vol. ×11
	TrisHCl, pH7,4	1,0 M	100 mM	50 $\mu$ l	0,55 ml
	MgCl <sub>2</sub>	50 mM	5,0 mM	50 $\mu$ l	0,55 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	-	-	250 $\mu$ l	2,75 ml
	MUF-Lsg.	5,0 mM	500 $\mu$ M	50 $\mu$ l	0,55 ml
	TestMix			400 $\mu$ l	
<b>- Vorbereitung :</b> in Eppendorfcups auf Eis vorlegen					
	Homogenat	-	-	50 $\mu$ l	
<b>- Vorinkubation :</b> nach Zeitschema Homogenat zugeben, gut mischen, 2 min bei 37°C inkubieren					
	UDPGA-Lsg.	30 mM	3,0 mM	50 $\mu$ l	0,55 ml
	Gesamtvol.			500 $\mu$ l	
<b>- Start der Enzymreaktion :</b> UDPGA-Lösung zugeben, kurz kräftig schütteln, bei 37°C definierte Zeitspanne inkubieren					
	HClO <sub>4</sub>	500 mM	250 mM	500 $\mu$ l	5,5 ml
<b>- Enzymreaktion stoppen :</b> eiskalte HClO <sub>4</sub> -Lösung zugeben, gut schütteln					
<b>- Niederschlag entfernen :</b> 5 min bei ca. 20000×g ( 13000rpm bei 10cm ) und ca. 20°C zentrifug.					
<b>- Phasenextraktion :</b> 750 $\mu$ l des Überstands in Reagenzglas mit vorgelegten 2,0 ml Chloroform überführen, 30 s vortexen, 5 min bei 4000×g ( 5000rpm bei 14,5 cm ) und ca. 20°C zentrifugieren.					
<b>- Umpuffern :</b> 500 $\mu$ l der oberen, wässrigen Phase in Eppendorfcup überführen, mit 500 $\mu$ l Glycin-NaOH-Puffer pH 10,3 versetzen.					
<b>- Messung :</b> Fluoreszenz im Fluoreszenz Spektrometer Perkin-Elmer LS 5B messen ( Autozero mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ; Slit 2,5/2,5, Resp.2, FixScl. 1 ; Exzitation 315 nm, Emission 365 nm ).					

**Auswertung**

Mit dem Geräte- und Meßbedingungs-spezifischen "apparenten Fluoreszenz-Koeffizienten" des MUF-Glucuronids von 46 FU/(nM/1ml), der Proteinkonzentration 'cProtein' des Homogenats und der Einrechnung des Arbeitsprotokoll-bedingten Faktors von 0,5 ( die Reaktions-

lösung wird zu 1000 µl wässriger Phase aufgefüllt und davon - nach der Abtrennung von Niederschlag und der Phasenextraktion - nur 500 µl zur Messung eingesetzt ) ergibt sich die spezifische UDP-Glucuronosyltransferase-Aktivität zu :

$$43,5 \text{ nmol}/(\text{min} \times \text{mg Protein}) \times \frac{\text{Fluoreszenzänderung} / [\Delta \text{FU}]}{\text{Reaktionszeit} / [\text{min}] \times \text{Volumen(Homogenat)} / [\mu\text{l}] \times \text{cProtein(Homogenat)} / [\text{mg/ml}]}$$

Die Fluoreszenzänderung  $\Delta \text{FU}$  berechnet sich aus der Differenz des Einzelwerts und einer Mehrfachbestimmung des Reagenzien-Leerwerts ( sofort gestoppte Ansätze ).

### 2.3.4 Chinonreduktase Enzymtest

Bei dieser Methode ( Lind C. et al., 1990 ) handelt es sich um einen gekoppelten Test, bei dem Menadion als Substrat der NAD(P)H:Chinon Oxidoreduktase dient. Erzeugtes Menadiol reduziert in einer nicht-enzymatischen Reaktion oxidiertes Cytochrom c, dessen Umsetzung direkt im Photometer mitverfolgt wird. Da man durch die direkte Messung der Reaktionsgeschwindigkeit das Einsetzen einer Kosubstrat-Erschöpfung erkennen kann, wird der Einsatz des Kosubstrats NADH als solches ermöglicht ( anstatt es durch ein regenerierendes System bereitzustellen, vgl. 2.3.5 ). Eine ausreichende Spezifität der Messung erreicht man durch den Vergleich eines Dicumarol-gehemmten und eines ungehemmten Ansatzes.

#### Lösungen, Puffer

	Komponente	Konzentr.	Bemerkung
Basis-Puffer	Tris	62,5 mM	757mg / 100ml bei 121,1 g/mol
	Triton X100	0,1 %	100µl / 100ml
	HCl	pH 7,5	
Dicumarol-Lsg.	Dicumarol	1,0 mM	16,8mg / 50ml bei 336,3 g/mol
	KOH	25 mM	125µl 10M KOH-Lösung / 50ml
Menadion-Lsg.	Menadion	10 mM	27,6mg / 10ml bei 276,2 g/mol
NADH-Lsg.	NADH	12,5 mM	7,45mg / 840µl bei 709,4 g/mol
Cytochrom-Lsg.	Cytochrom c	1925 µM	20,0mg / 840µl bei 12380 g/mol

Dicumarol = 3,3'-Methylenbis(4-hydroxycoumarin), Menadion = 2-Methyl-1,4-naphthochinon, Cytochrom c ( 'from horse heart, prep. without TCA' ) : Sigma-Aldrich, St.Louis ( USA ) ; NADH = Dihydronicotinamid-adenin-dinucleotid ( Dinatriumsalz, 'grade II' ) : Roche Molecular Biochemicals, Mannheim .

Die Dicumarol- und die Menadion-Lösung wurden in 21×Aliquoten bei -20°C gelagert, das NADH und das Cytochrom-c als Feststoff voraliquotiert, entsprechend den Herstellerangaben lichtgeschützt gelagert und erst unmittelbar vor Versuchsbeginn gelöst.

**Arbeitsprotokoll**

Arbeits-schritt	Komponente	Stamm-konzentr.	End-konzentr.	Volumen		Vol. ×21
				ohne Dicumarol	mit Dicumarol	
	TrisHCl, pH 7,5 Triton X100	62,5 mM 0,1 %	50 mM 0,08 %	--->	800 µl	16,8 ml
- auf 30°C vortemperierten Basis-Puffer in Küvette vorlegen ( ergibt Endtemperatur von 25°C )						
	Wasser			110-x µl	100-x µl	
	Dicumarol-Lsg.	1,0 mM	10 µM	-	10 µl	105 µl
	Menadion-Lsg	10 mM	100 µM	--->	10 µl	210 µl
	NADH-Lsg.	12,5 mM	500 µM	--->	40 µl	840 µl
	Cytochrom-Lsg.	1925 µM	77 µM	--->	40 µl	840 µl
- Lösungen ( lichtgeschützt auf Eis gelagert ) nacheinander zupipettieren, mischen durch Trituieren						
- Photometer starten, 40-50 s unter Detektion der Absorption äquilibrieren lassen						
	Homogenat			--->	x µl	
- Homogenat zupipettieren, schnellstmöglich durch Trituieren mischen und mit Messung fortfahren						
Gesamt-Ansatz				--->	1000 µl	

Nach Zugabe der Menadion-Lösung muß unbedingt zügig weitergearbeitet werden.

**Auswertung**

Die Bestimmung der Absorptionsänderungsrate (  $\Delta A/\Delta t$  ) wurde mit Hilfe der Differenzierungs-Funktion des verwendeten Photometers durchgeführt. Mit dem Absorptionskoeffizienten der Cytochrom-c-Reduktion bei 550 nm ( 18,5 OD/(cm×mM) ; äquimolar zur Umsetzung des Chinonreduktase-Substrats Menadion ), der Proteinkonzentration 'cProtein' des Homogenats und den Parametern der photometrischen Messung ( V(Küvette) = 1,0ml ; d(Strahlengang) = 1,0cm ) ergibt sich die spezifische Menadion-reduzierende Aktivität zu :

$$3243 \text{ nmol}/(\text{min} \times \text{mgProtein}) \times \frac{\Delta A/\Delta t / [\text{mOD/s}]}{V(\text{Homogenat}) / [\mu\text{l}] \times c\text{Protein}(\text{Homogenat}) / [\text{mg/ml}]}$$

Die spezifische Chinonreduktase-Aktivität erhält man dann durch Differenzbildung zwischen den Werten eines Dicumarol-gehemmten und eines nicht gehemmtten Ansatzes.

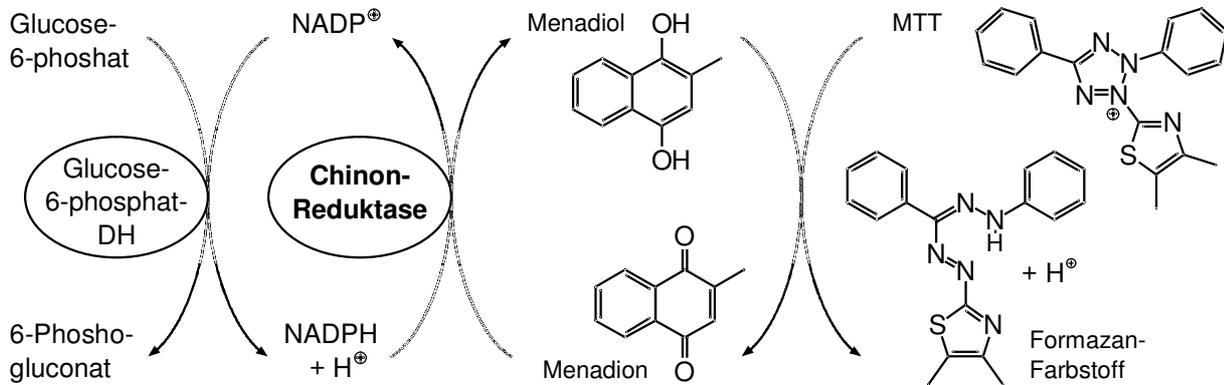
**2.3.5 Chinonreduktase Screening-Test**

Beim NAD(P)H:Chinon Oxidoreduktase Screening-Test ( Prochaska H.J., Santamaria A.B., 1988 ; Spencer S.R. et al., 1990 ; Prochaska H.J. et al., 1992 ) handelt es sich um einen gekoppelten gestoppten Enzymtest. Primär wird von der Chinonreduktase Menadion in Menadiol umgesetzt ( Abb. 9 ). Letzteres reduziert dann in einer nicht-enzymatischen Reaktion MTT in einen blauen Farbstoff ( gekoppelte Indikator-Reaktion ). Das von der Chinonreduktase benötigte Kosubstrat NADPH ( führt zu höherer Spezifität als NADH ) wird mit Hilfe der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ständig aus NADP nachgebildet ( Kosubstrat-regenerierendes System ). Substrat-Erschöpfung und Produkt-Hemmung werden damit umgangen. Die Reaktion wird durch Zugabe von Dicumarol gestoppt und dann über eine photometrische Messung die Menge des entwickelten Farbstoffes bestimmt.

Das als Indikator eingesetzte MTT kann auch von Enzymen des inneren mitochondrialen Kompartiments reduziert werden. Deshalb wird mit Digitonin lysiert, das aufgrund seiner Wirkungsweise ( komplexiert Cholesterol, in der Plasmamembran in hohen und in Mitochondrien

in nur sehr geringen Anteilen vorhanden ) bei ausreichendem Aufschluß der Zellen Mitochondrien weitgehend unversehrt läßt.

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgt anhand der photometrischen Messung gebundenen Kristallvioletts. Da hiermit die Messung enthaltenen Proteins und gebildeten Produkts auf der selben Grundlage erfolgt, wird die Auswertung erheblich vereinfacht ( s.u. ).



**Abb. 9 :** Chemische Umsetzungen beim NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase-Screening-Test.

**Geräte :** Multititerplatten-Reader 'SLT-Spectra' : SLT LabInstruments Deutschland GmbH, Crailsheim ; Mehrkanal-Pipette ( 20-200 µl ) 'Transferpette-12' : Brand, Wertheim

**Verbrauchsmaterial :** 96well-Multititer-Kulturplatten 'Falcon 353075' : Becton Dickinson, Heidelberg.

### Lösungen, Material

Die angegebenen Mengen und Volumina ermöglichen die Messung der Zellmengen-spezifischen Chinonreduktase-Aktivität von 10 Behandlungsgruppen mit logarithmischem Konzentrationsgradient und 1 Kontroll-Gruppe jeweils als 8-fach-Bestimmung. Benötigt werden dazu 2 Multititer-Zellkulturplatten ( 1 Enzym-Aktivitäts- und 1 Zellmengen-Bestimmung ).

	Komponente	Konzentr.	Bemerkung
Zellsuspension	Hepa1c1c7-Zellen	50.000 Z./ml	2,0×10 <sup>6</sup> Zellen
	Hepa-Kulturmedium		40 ml
Behandlungsmedium	Hepa-Kulturmedium		40 ml
	Penicillin G	100 u/ml	( Biochrom, Berlin )
	Streptomycin	100 µg/ml	( Biochrom, Berlin )
	DMSO bzw. Wirkstoff in DMSO	0,1%	
Digitonin-EDTA-Lösung	Digitonin	0,8 %	800 mg / 100ml
	EDTA	2 mM	800µl 0,25M EDTA-Lsg. / 100ml
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad	90 ml / 100ml ; lösen durch Erhitzen auf 98°C, schnell abkühlen
	NaOH	pH 7,8	
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad	100 ml ; bei Niederschlags-Bildung erneut erwärmen ; ( 5 ml pro Ansatz )
Reaktions-Puffer	Tris	500 mM	6,06g / 100 ml bei 121,1 g/mol
	Tween-20	0,2 %	200µl / 100 ml
	HCl	pH 7,4	
FAD-Lösung	FAD	5,0 mM	4,15mg / 1,0ml bei 829,5 g/mol ; lag. bei -20°C
Gluc.-6-ph.-Lsg.	D-Glucose-6-phos.	100 mM	28,2mg / 1,0ml bei 282,1 g/mol
NADP-Lösung	NADP	30 mM	23,0mg / 1,0ml bei 765,4 g/mol ; lag. bei -20°C

Menadion-Lsg.	Menadion	50 mM	13,8mg / 1,0ml Acetonitril bei 276,2 g/mol
Reaktions-Lsg.			frisch herstellen
	TrisHCl, pH 7,4	25 mM	1,0ml Reaktions-Puffer / 20ml
	Tween-20	0,01 %	
	BSA	667 µg/ml	13,3 mg / 20ml
	FAD	5,0 µM	20 µl FAD-Lösung / 20ml
	D-Glucose-6-phosph.	1,0 mM	200 µl Glucose-6-phosphat-Lösung / 20ml
	NADP	30 µM	20µl 30mM NADP-Lösung / 20ml
	Glucose-6-ph. DH	2,0 u/ml	40u / 20ml
	MTT	0,3 mg/ml	6,0mg / 20 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad	20 ml
			erst unmittelbar vor Gebrauch zugeben :
	Menadion	50 µM	20µl Menadion-Lsg. / 20ml
Dicumarol-Lsg.	Dicumarol	0,30 mM	10,1mg / 100ml bei 336.3 g/mol
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,0 mM	68,0mg / 100ml bei 136,1 g/mol
	KOH	pH 7,4	
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad	100ml ; ( 5ml pro Ansatz )
Kristallviolett-Lsg.	Kristallviolett	0,2 %	1,0g / 500ml
	Ethanol	50 %	250ml / 500ml
	H <sub>2</sub> O	ad	500ml ; ( wiederverwendbar )
SDS-Lösung	SDS	0,5 %	5,0ml 20%-ige SDS-Lsg. / 200ml
	Ethanol	50 %	100ml / 200ml
	H <sub>2</sub> O	ad	200ml ; ( 20ml pro Ansatz )

FAD = Flavin-adenin-dinucleotid ( Dinatriumsalz ), NADP = Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat ( Natriumsalz ), D-Glucose-6-phosphat ( Dinatriumsalz Hydrat, 98-100% ), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ( Type XV, from Bakers Yeast ), MTT = 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazoliumbromid : Sigma-Aldrich, St.Louis USA ; BSA = 'Bovine Serum Albumine' : Serva, Heidelberg .

Induktoren : Quercetin, Chlorogensäure, Kaffeesäure : Sigma-Aldrich, St.Louis ( USA ) .

### Arbeitsprotokoll

Zur Kultivierung und Behandlung der Zellen wurden 2 96well-Multititer-Kulturplatten ( pro Ansatz ) bis auf jeweils 1 randständige Spalte ( 8 Mulden jeweils als Reagenzienleerwert ) mit je 200 µl Zellsuspension beschickt ( immer wieder gründlich aufschlänmen, eine einheitliche Zelldichte ist für eine sinnvolle Auswertung unbedingt erforderlich ) und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchte inkubiert. Nach 24 h pipettierte man überschüssiges Medium ab und stellte durch geeignetes Vorlegen von Medium ohne Wirkstoff, Zupipettieren des Mediums mit der höchsten Wirkstoffkonzentration sowie sukzessives Mischen und Überführen auf Behandlungsgruppen mit niedrigerer Konzentration eine logarithmische Konzentrationsabstufung des Wirkstoffs mit einem Volumen von ca. 200 µl pro Mulde her ( beispielsweise für Faktor 2 180 µl des Mediums mit der höchsten Konzentration zu 180 µl zugeben, mischen und wieder 180 µl zu nächster Behandlungsgruppe überführen - für andere Faktoren f bei vorgelegtem Volumen V jeweils  $[f-1] \times V$  ). Mindestens eine nicht randständige Spalte wurde als Kontrolle ohne Wirkstoff belassen. Die Zellkulturen inkubierte man daraufhin weitere 24h.

Für den Enzymtest wurde von einer der beiden Platten zunächst das Medium gründlich abdekantiert ( ggf. mit PBS etwas nachspülen ). Der Aufschluß des Zellmaterials erfolgte durch Inkubation - 10 min bei 37°C und weitere 10 min bei ca. 25°C auf einem Schüttler - mit jeweils 50 µl Digitonin-EDTA-Lösung. Die Enzymreaktion startete man dann durch Zugabe von 200 µl Reaktions-Lösung und stoppte die Umsetzung nach 5 min ( bei nicht ausreichen-

der Farbreaktion auch später ) mit Hilfe von von 50 µl Dicumarol-Lösung. Die Messung der Farbreaktion wurde bei 610 nm durchgeführt.

Für die Zellmengen-Bestimmung entfernte man von der anderen Platte das Medium und badete diese dann 10 min in Kristallviolett-Lösung. Daraufhin wurden die Mulden 2 min vorsichtig mit Leitungswasser ausgespült, mit je 200 µl SDS-Lösung beschickt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Messung des durch die Zellrasen zurückgehaltenen Farbstoffes erfolgte ebenfalls bei 610 nm.

### Auswertung

Die mit einem Multititerplatten-Photometer gemessene Absorption ist - unabhängig vom Lösungsvolumen - proportional dem enthaltenen Farbstoff pro Flächeneinheit. Mit den Absorptionskoeffizienten der MTT-Reduktion bei 610nm ( 11,3 OD/(cm×mM) ; äquimolar zur Umsetzung des Chinonreduktase-Substrats Menadion ) und Kristallviolett-gefärbtem Protein bei 610nm ( 37,8 OD/(cm×mg/ml) ) ergibt sich die spezifische Chinonreduktase-Aktivität zu :

$$3345 \text{ nmol}/(\text{min} \times \text{mg Protein}) \times \frac{\text{Absorptionänderung MTT} / [\Delta \text{OD}]}{\text{Reaktionszeit} / [\text{min}] \times \text{Absorption Kristallviolett} / [\text{OD}]}$$

## 2.4 Quantifizierung der UGT1A6-mRNA-Expression mittels RT-PCR

### 2.4.1 Allgemeines

Bei den im folgenden beschriebenen Methoden zur Isolierung von Gesamt-RNA, Herstellung von cDNA und Amplifikation mittels PCR ( vgl. Diplomarbeit Schmohl S., 1998 ) wurden die üblichen Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung von RNase-Einträgen und Verunreinigungen mit Polynukleotiden aus der Umgebung getroffen ( Handschuhe, Verwendung von hochreinem, für Injektions-Zwecke hergestellten Wasser usw. ).

### 2.4.2 RNA-Isolation

Das eingesetzte Verfahren wurde - geringfügig modifiziert - der Produktbeschreibung des 'TRIzol'-Reagenz entnommen. Die Methode stellt eine Weiterentwicklung der RNA-Isolation mittels "Säure-Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion" ( Chomczynski P., Sacchi N., 1987 ) dar. Sie liefert in weniger Arbeitsschritten besser lösliche RNA.

Ein aufgrund des Guanidiniumthiocyanat- und Phenol-Gehalts stark chaotroper ( intermolekulare Wechselwirkungen unterbindender ) Puffer löste dabei das Zellmaterial auf, die gleichzeitig erfolgende Denaturierung unter anderem von RNasen und Nukleoproteinen schützte enthaltene RNA vor einem enzymatischen Abbau und löste sie aus Protein-Komplexen. Nach Zugabe von Chloroform trennte man in einer Phasenextraktion die in der oberen wässrigen Phase enthaltene RNA von DNA in der Interphase und denaturiertem Protein in der unteren Phenol-Chloroform-Phase. Abschließend wurde in alkoholischer Lösung selektiv präzipitiert und entsalzt.

### Material

pro 10cm-Zellkulturschale 3ml 'TRIzol'-Reagenz ( Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein ), 600µl Chloroform, 1,5ml Isopropanol, 6ml 70%-ige Ethanollösung und 100-500 µl hochreines Wasser ( H<sub>2</sub>O<sub>ad inj.</sub> ; 'Aqua ad injectabilia' : Delta Pharma, Pfullingen ) ; phe-

nolresistentes 15ml-Zentrifugenröhrchen 'Nunc 366060' : Nalge Nunc International Corp., Naperville ( USA ) .

### Arbeitsprotokoll

1. **Homogenisierung** : Die zu verarbeitenden Zellkulturen wusch man zunächst 2 Mal mit PBS-Puffer, gab dann je 10cm-Kulturschale ( 60 cm<sup>2</sup> ) 3 ml Trizolreagenz zu und frof diese ggf. bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C ein. Das angelöste Zellmaterial wurde dann in ein ( phenolresistentes ) 15ml-Zentrifugenröhrchen überführt, durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und 5 min bei ca. 20°C inkubiert.
2. **Phasenextraktion** : Man versetzte nun mit 600 µl Chloroform, schüttelte im verschlossenen Röhrchen 15 s sehr kräftig von Hand und inkubierte nochmals 3 min bei ca. 20°C. Es wurde jetzt 30 min bei 6000×g und 4°C zentrifugiert und daraufhin die obere, wässrige Phase in ein neues 15ml-Zentrifugenröhrchen überführt, ohne dabei Anteile der Interphase oder unteren Phase zu verschleppen.
3. **Selektive Präzipitation, Entsalzung** : Die überführte Lösung versetzte man mit 1,5 ml Isopropanol, inkubierte 10 min bei ca. 20°C, zentrifugierte 30 min bei 6000×g und 4°C, nahm den Überstand ab, versetzte mit 6 ml 70%-igen Alkohols, zentrifugierte jetzt 15 min bei 6000×g und 4°C und entfernte den Überstand vollständig.
4. **Lösung der RNA** : Die RNA wurde maximal 5min an der Luft getrocknet, in 100 µl ( ggf. auch mehr ) hochreinem Wasser aufgenommen und abschließend bis zur Homogenität gelöst - indem man 3 Mal nacheinander die Lösung einfro, kurz auf 55°C erhitze und ca. 1 min trituierte - dann photometrisch gemessen und schließlich auf einen einheitlichen RNA-Gehalt von 1,0 µg/µl eingestellt ( vgl. 2.5.2.1 ).

### 2.4.3 Reverse-Transkriptase-Reaktion

Es wurde der 'SuperScript II, RNase H- Reverse Transcriptase'-Kit der Firma 'Gibco BRL Life Technologies' verwendet und das in der Produktbeschreibung aufgeführte Arbeitsprotokoll in folgenden Punkten modifiziert : 1.) Zugabe des RNase-Inhibitors 'RNasin' ; 2.) Verwendung eines Primer- und eines Enzym-Mixes zur Verminderung von Pipettierfehlern ; 3.) Statt Zupipettierens des Enzyms nach 2 min bei 42°C Abkühlen auf 4°C, dann Versetzen aller Ansätze mit Enzym und schließlich Fortführen der Inkubation bei 42°C ( definierte Primeranlagerungs-Bedingungen für alle Ansätze ); 4.) Verlängerung der cDNA-Synthese-Phase von 50 min auf 90 min. Mit Hilfe dieser Veränderungen konnte die Reproduzierbarkeit der Reverse-Transkriptase- ( RT- ) Reaktion wesentlich erhöht werden ( rSD < 10%, Daten nicht gezeigt ).

#### Material

'SuperScript II, RNase H- Reverse Transcriptase' ( enthaltene Komponenten : Enzym, 5×'First Strand Buffer', 0,1M Dithiothreitol ) : 'Gibco BRL Life Technologies' ; Oligo(dT)<sub>15</sub> : Roche Molecular Biochemicals, Mannheim ; 'Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor' : Promega, Madison ( USA ) ; 'Ultrapure dNTP Set' : Pharmacia Biotech, Freiburg .

#### Lösungen

	Komponente	Konzentr.	Bemerkung
Oligo(dT) <sub>15</sub> -Lösung	Oligo(dT) <sub>15</sub>	100 µM	8,0nmol / 80µl
dNTP-Mix	dATP	10 mM	10µl 100mM dATP-Lösung / 100µl
	dTTP	10 mM	10µl 100mM dTTP-Lösung / 100µl
	dGTP	10 mM	10µl 100mM dGTP-Lösung / 100µl
	dCTP	10 mM	10µl 100mM dCTP-Lösung / 100µl

## Arbeitsprotokoll

Alle Pipettierschritte führte man bei 4°C mit vorgekühlten Lösungen und Gefäßen durch, gemischt wurde durch Trituieren oder Schwenken von Hand. Die Temperaturprotokolle wurden mit Hilfe des PCR-Thermocyclers ( siehe 2.1 ) verwirklicht.

Arbeitsschritt	Komponente	Stammkonz.	Endkonz.	Gesamtvol. [ µl ]	Einzelvol. [ µl ]
	RNA	200 ng/µl	50 ng/µl	-->	5,0
- Vorlegen in PCR-Cups :	<b>RNA-Proben</b>				<b>5,0</b>
	H <sub>2</sub> O <sub>ad inj</sub>	-	-	4,5	2,6
	Oligo(dT) <sub>15</sub>	100 µM	5 µM	-->	1,0
- Zupipettieren :	<b>Primer-Mix</b>				<b>3,6</b>
<b>- Inkubieren :</b>	4°C -- 15 min 70°C -- 4°C ( RNA-Denaturierung )				
	H <sub>2</sub> O <sub>ad inj</sub>			^	0,1
	First-Strand-Buffer	5×	1×	4,0	3,2
	Dithiothreitol	100 mM	10 mM	2,0	1,6
	RNAsin	40 u/µl	1 u/µl	-->	0,5
	dNTP-Lösung	10 mM	1 mM	-->	2,0
- Zupipettieren	<b>dNTP-Mix</b>				<b>7,4</b>
<b>- Inkubieren</b>	4°C -- 2 min 42°C -- 4°C ( Primer-Annealing )				
	H <sub>2</sub> O <sub>ad inj</sub>			^	1,8
	First-Strand-Buffer			^	0,8
	Dithiothreitol			^	0,4
	Rev. Transkriptase	200 u/µl	10 u/µl	-->	1,0
- Zupipettieren	<b>Enzym-Mix</b>				<b>4,0</b>
<b>- Inkubieren</b>	4°C -- 90min 42°C -- 15min 70°C -- 4°C ( Rev.-Transkriptase-Reakt. )				
	<b>Gesamt-Ansatz</b>				<b>20,0</b>

## 2.4.4 Polymerase-Ketten-Reaktion

### 2.4.4.1 Primer

#### Primer-Design

Um hinsichtlich theoretischer Aspekte zu Spezifität und Amplifizierungseffizienz von Polymerase-Ketten-Reaktionen ( PCR ) optimierte Primer-Paare auszuwählen, ging man im Falle der nachzuweisenden Zieltranskripte ( UGT1A6, GAPDH, β-Aktin, bei allen existieren mehrere andere Transkripte mit hoher Sequenz-Homologie ) folgendermaßen vor :

Zunächst wurden sämtliche bekannten Sequenzen des zu amplifizierenden Transkripts und ggf. ( für die Bestimmung der Exon-Intron-Übergänge ) die des korrespondierenden Genabschnitts sowie sämtliche bekannten Transkripte und Pseudogene mit Sequenzen hoher Homologie ( im Falle der UGT1A6 z.B. die gesamte UGT1A-Familie ) gesammelt ( Genbank, z.B. 'http://www.ncbi.nlm.nih.gov/' ). Für die Bestimmung der Exon-Intron-Übergänge führte man mittels eines geeigneten Programms ( vgl. 2.10 ) eine Sequenzhomologie-Analyse der Transkript- und Gen-Sequenzen durch.

Die Transkript-Sequenz und alle Sequenzen mit Bereichen hoher Homologie wurden ebenfalls einer Sequenzhomologie-Analyse unterworfen. Die erhaltene Darstellung untersuchte man hinsichtlich "Fenstern" von 5 Nukleotiden Länge, die eine vollständige Übereinstimmung in allelischen bzw. Mutationsvarianten des Zieltranskripts, dahingegen mindestens eine Fehl-

paarung gegenüber homologen Sequenzen bzw. Pseudogenen aufwiesen ( die "Fenster" stellen die zukünftigen 3'-Enden der Primer dar ).

Der Bereich 'upstream' und 'downstream' der gefundenen "Fenster" wurde auf entsprechende Fehlpaarungen im Bereich der nächsten 35 Nukleotide untersucht. Hinsichtlich des 'upstream'-Bereiches geeignete Abschnitte favorisierte man als 'Forward'-, hinsichtlich des 'downstream'-Bereiches geeignete Abschnitte als 'Reverse'-Primer. Abschnitte mit nicht translatierten Anteilen wurden verworfen, solche mit vielen Fehlpaarungen bezüglich nicht zu amplifizierender Polynukleotid-Sequenzen am 3'-Ende und in der Mitte des Primer-Abschnitts bevorzugt.

Die erhaltenen Primer-Abschnitte kombinierte man so zu möglichen Primerpaaren, daß möglichst kurze, Intron-überspannende Abschnitte ( zur Erzeugung sogenannter 'Intron-überspannender' Primer, die Störeinflüsse durch eventuell vorhandene Verunreinigungen genomischer DNA wirksam verhindern ; Guiffre A. et al., 1993 ) eingegrenzt wurden. Nach Möglichkeit wählte man so mehrere, verschiedene Bereiche des Transkripts amplifizierende Primerpaare aus.

Die möglichen Kombinationen von 'Forward'- und 'Reverse'-Primern ( bei Multiplex-PCR, s.u., einschließlich denjenigen anderer zu amplifizierender Polynukleotidsequenzen ) wurden auf komplementäre Sequenzen am 3'-Ende ( Gefahr der Bildung von Primer-Dimeren ) untersucht und ggf. verworfen.

Für jeden Primer bestimmte man nun die theoretischen Hybridisierungstemperaturen in Abhängigkeit von der Länge ( 3'-Ende entspricht "Fenster", 5'-Ende variabel ). Die Primer eines Primerpaares ( bei zu etablierender Multiplex-PCR alle Primer einschließlich denjenigen anderer zu amplifizierender Polynukleotidsequenzen ) wurden durch Auswahl ihrer Länge in 5'-Richtung auf ähnliche Hybridisierungstemperaturen abgeglichen.

Die Festlegung der Primerlängen basierte dabei auf einer Berechnung der theoretischen Hybridisierungstemperaturen für DNA:DNA-Doppelstränge ( Casey J., Davidson N., 1977 ) in Abhängigkeit von der Länge bei Beibehaltung des 3'-Terminus. Nach Einbeziehung empirisch ermittelter Daten ( nicht gezeigt ) ergab sich :

$$T_{\text{Hybr.}} / [ ^\circ\text{C} ] = 67,5 + 0,41 \times \text{GC-Anteil} / [ \% ] - \frac{600}{\text{Doppelstranglänge} / [ \text{bp} ]}$$

Die sich ergebenden tabellarischen Ausgaben eines entsprechenden Programms verwendete man dann für eine "manuelle" Auswahl der Primerlängen.

Die erhaltenen Primersequenzen überprüfte man hinsichtlich der intrachenaären Sekundärstruktur und verwarf sie bei ausgedehnten Basenpaarungen. Für die verbleibenden Sequenzen führte man eine Datenbanksuche nach homologen Sequenzen durch. Ggf. wurden gefundene Sequenzen in die Sequenzhomologie-Analyse einbezogen und die Primerauswahl dementsprechend revidiert.

## Primer-Sequenzen

**UGT1A6-mRNA** : codierende Sequenz 1 - 2322, 5 Exons

Forward-Primer : 1-23 ( Exon 1 ) = ATGGCCTGCCTCCTTCGCTCATT ; 23 bp, 56,5% GC, 64,6°C

Reverse-Primer : 928-906 ( Exon 2 ) : CCATTGATCCCAAAGAGAAAACC ; 23 bp, 43,5% GC, 59,2°C

Amplifikat : 928 bp, 1 Intron überspannend

**GAPDH-mRNA** : codierende Sequenz 1 - 1008, 8 Exons

Forward-Primer : 430-453 ( Ex. 5 ) = CCCTCTGCTGATGCCCCCATGTTT ; 24 bp, 62,5% GC, 68,1°C

Reverse-Primer : 716-695 ( Exon 7 ) = TTGCCACACAGCCTTGGCAGCGC ; 22 bp, 68,2% GC, 68,2°C

Amplifikat : 287 bp, 2 Introns überspannend

**β-Aktin-mRNA** : codierende Sequenz 1 - 1128, 5 Exons

Forward-Primer : 899-921 ( Exon 4 ) = CTGGCGGCACCACCATGTACCCT ; 23 bp, 65,2 % GC, 68,1°C

Reverse-Primer : 1104-1082 ( Ex. 5 ) = GGAGGGGCCGACTCGTCATACT ; 23 bp, 65,2% GC, 68,1°C

Amplifikat : 206 bp, 1 Intron überspannend

### Bezug der Primer, Herstellung der Primer-Lösungen

Die Primer-Oligonukleotide wurden von der 'MWG-Biotech AG', Ebersberg, als Lyophilisat bezogen ( '<http://www.mwgdna.com/>' ), in hochreinem Wasser entsprechend der Herstellerangaben zu 20µM Lösungen gelöst und in 200µl-Aliquoten bei -20°C gelagert.

#### 2.4.4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Bei der hier beschriebenen Methode handelt es sich um eine "vergleichende" RT-PCR ( Chelly J. et al., 1990 ; u.a. als 'comparative RT-PCR oder 'Duplex-RT-PCR' bezeichnet ), die endogene mRNA von 'Housekeeping'-Genen ( deren mRNA-Spiegel meist weitgehend unabhängig von spezifischen Einflüssen ist ) koamplifiziert und die erhaltene Amplifikat-Menge als internen Standard verwendet. Der den Spiegel der zu untersuchenden mRNA-Spezies repräsentierende Wert ist dann das Verhältnis zwischen dessen Amplifikat-Menge und der Amplifikat-Menge des internen Standards. Durch dieses Vorgehen werden maßgebliche Ursachen von Streuungen bei der PCR eliminiert.

Ein im Zusammenhang mit dieser Methode häufig auftretendes Problem besteht in stark unterschiedlichen Ausgangsmengen an "Ziel"- und "Bezugs"-Transkript in den zu bestimmenden Proben. Das Verfahren des 'primer-droppings' ( Wong H. et al., 1994 ) löst diesen Umstand, indem das in geringeren Mengen vorhandene Transkript zunächst einige Zyklen voramplifiziert wird und dann erst die Primer der anderen Transkripte zupipettiert werden.

Mit dem hier aufgeführten Arbeitsprotokoll konnte nach Optimierung der Zyklenzahl vor und nach Zugabe der Bezugsprimer ( es sollten sowohl vom Ziel- als auch von den Bezugstranskripten ähnliche Amplifikatmengen erhalten und insgesamt die PCR noch vor Verlassen der exponentiellen Phase gestoppt werden, vgl. 3.2.1 ) und Auswahl der verwendeten Polymerase Korrelationskoeffizienten zwischen den Ergebnissen unabhängig durchgeführter Experimente über 0,98 erzielt werden ( Daten nicht gezeigt ).

#### Material

'HotStarTaq DNA Polymerase'-Kit ( u.a. enthaltene Komponenten : Enzym, 10× PCR Buffer, MgCl<sub>2</sub> 25mM ) : Qiagen, Hilden ; [α-<sup>32</sup>P]dCTP 370 kBq/µl 3,33 pmol/µl : Amersham, Braunschweig ; dNTP-Lösung 10mM : vgl. 2.4.3 ; Primer-Lösungen : vgl. 2.4.4.1

#### Arbeitsprotokoll

Alle Pipettierschritte führte man bei 4°C durch, gemischt wurde durch Trituieren oder Schütteln von Hand. Insbesondere achtete man auch darauf, daß vor dem Vorlegen bzw. Zupipettieren von cDNA, dNTP, Primern und der Polymerase sowohl die Gefäße als auch ggf. bereits vorhandene Flüssigkeit ausreichend vorgekühlt waren.

Die bei der angewendeten Methode des "Primer-Droppings" ( Voramplifizieren eines Teils der zu vermehrenden Transkripte einer Multiplex-PCR durch späteres Zupipettieren der die anderen Transkripte vervielfältigenden Primer ) notwendige Unterbrechung des Temperaturzyklus stellt einen kritischen Arbeitsschritt in Hinsicht auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse dar. Darum wurde neben dem unbedingt erforderlichen ununterbrochenen Arbeiten auf Eis darauf geachtet, diesen Schritt in maximal 6 min durchzuführen und durch sorgfältiges Pipettieren ein "Herunterzentrifugieren" der Ansätze ( kurzfristige Erwärmung der Reaktionslösungen ! ) so weit wie möglich obsolet zu machen.

Die Temperaturprotokolle wurden mit Hilfe des PCR-Thermocyclers ( siehe 2.1 ) verwirklicht.

Arbeitsschritt	Komponente	Stamm-konz.	End-konz.	Volumen [ $\mu$ l ]
	cDNA	0,5 ng/ $\mu$ l	0,1 ng/ $\mu$ l	2,50
- Vorlegen in PCR-Cups :	<b>cDNA-Proben</b>			<b>2,50</b>
	H <sub>2</sub> O <sub>ad inj</sub>			3,74
	PCR-Puffer ( inkl. MgCl <sub>2</sub> )	10 $\times$ 15 mM	1 $\times$ 1,5 mM	1,25
	MgCl <sub>2</sub> -Lösung	25 mM	1,0 mM	0,50
	dNTP-Lösung	10 mM	0,4 mM	0,50
	UGT1A6-F.-Primer	20 $\mu$ M	1,0 $\mu$ M	0,63
	UGT1A6-R.-Primer	20 $\mu$ M	1,0 $\mu$ M	0,63
	HotStar-Polymerase	5 u/ $\mu$ l	0,04 u/ $\mu$ l	0,10
	[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dCTP	3,33 $\mu$ M 370 kBq/ $\mu$ l	40 nM 4,4 kBq/ $\mu$ l	0,15
- Zupipettieren :	<b>PCR-Mix</b>			<b>7,50</b>
- Inkubieren :	4°C -- 15min 94°C -- 9 $\times$ [ 60s 94°C -- 40s 65°C -- 2min 72°C -- ] 2min 72°C -- 4°C			
	GAPDH-F.-Primer	20 $\mu$ M	1,6 $\mu$ M	1,00
	GAPDH-R.Primer	20 $\mu$ M	1,6 $\mu$ M	1,00
	$\beta$ -Aktin-F.-Primer	20 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	0,25
	$\beta$ -Aktin-R.-Primer	20 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	0,25
- Zupipettieren :	<b>Bezugsprimer-Mix</b>			<b>2,50</b>
- Inkubieren :	4°C -- 5 min 94°C -- 19 $\times$ [ 60s 94°C -- 40s 65°C -- 2min72°C -- ] 8min 72°C -- 4°C			
	<b>Gesamtansatz</b>			<b>12,50</b>

### 2.4.4.3 Gelelektrophorese

#### Geräte

horizontale Elektrophorese-Vorrichtung 'System V6' : Appligene oncor, Heidelberg ; Spannungsquelle 'LKB EPS 500/400' : Pharmacia Biotech, Freiburg ; Gel-Trockenvorrichtung 'Ferrotemp 60' : Biotech Fischer, Reiskirchen ; Kühlfalle : Bachhofer, Reutlingen .

#### Puffer, Lösungen

	Komponente	Konzentr.	Bemerkung
SDS-Lösung	SDS	0,1 %	500 $\mu$ l 20%-ige SDS-Lösung / 100ml
NaOH-Lösung	NaOH	5 %	5,0g / 100ml
5 $\times$ TBE-Puffer (pH 8,3)	Tris	445 mM	108g / 2,0l bei 121,1 g/mol
	Borsäure	445 mM	55g / 2,0l bei 61,83 g/mol
	EDTA	10 mM	7,45g / 2,0l bei 372,2 g/mol
APS-Lösung	APS	10 %	60mg / 600 $\mu$ l
Loading-Buffer	Bromphenolblau	0,25 %	25mg / 10ml
	Xylencyanol FF	0,25 %	25mg / 10ml
	Ficoll Typ 400	15 %	1,50g / 10ml
	EDTA	50 mM	2,0ml 0,25M EDTA-Lösung / 10ml

EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure ( Dinatriumsalz Dihydrat ) ; APS = Ammoniumperoxodisulfat : BioRad, München ; Xylencyanol FF : Serva, Heidelberg ; Ficoll Typ 400 : Pharmacia Biotech, Freiburg .

## Material

Dimethyldichlorsilan ; 'Rotiphorese Gel 30' ( 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid ) : Roth, Karlsruhe ; N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin ; Chromatographie-Papier 'Whatman 3 MM' : Whatman, England ; Haushaltsfolie

## Herstellung des Polyacrylamidgels

Die inneren Seiten der beiden Elektrophorese-Glasplatten ( ca. 20×30 cm ) wurden zunächst mit 0,1%-iger SDS-Lösung von Verunreinigungen befreit, mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> abgespült, mit 5%-iger NaOH-Lösung behandelt, nochmals abgespült und abschließend die Ohrenplatte ( diese hatte einen Ausschnitt, der während der Elektrophorese dem oberen Puffervorratsbehälter zugewandt war ) zusätzlich mit Dimethyldichlorsilan benetzt. Nach jedem Auftrag von Flüssigkeit wurde dabei das Glas trockengerieben, beim jeweils letzten Schritt mit fusselfreien Tüchern.

Die 0,75 mm dicken 'Spacer' ( Zwischenraum freihaltende Kunststoffstreifen ) wurden seitlich zwischen den Glasplatten positioniert, die unten und seitlich gelegenen Ränder mit geeignetem Klebeband abgedichtet und schließlich Klemmen im Bereich der Spacer-Streifen angebracht.

Für die Herstellung eines 6%-igen Polyacrylamid-Gels gab man in ein Becherglas ( Fassungsvermögen mindestens Vierfaches des Lösungsvolumens ) in der angegebenen Reihenfolge die folgenden Flüssigkeiten ( Ansatz für 60 ml ) :

Volumen	Komponente
35,3 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ( möglichst gasfrei, nicht aus Spritzflaschen )
12,0 ml	5×TBE-Puffer
12,0 ml	'Rotiphorese Gel 30' ( 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid )
60 µl	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
600 µl	10%-ige ( w/v ) APS-Lösung ( unmittelbar vor Gebrauch hergestellt )

Die erhaltene Lösung wurde nun kurz mit einem Magnetrührer gemischt und unmittelbar weiterverarbeitet.

Zur Vermeidung von Luft einschließen bei der Befüllung der Gelkammer positionierte man die Kammer horizontal, mit der Ohrenplatte nach oben und einem leichten Gefälle zur rechten unteren Ecke hin, und goß die Lösung zügig und ohne abzusetzen in die rechte Seite der Ohrenplatten-Aussparung. Sobald die Kammer auf diese Art und Weise knapp überrandvoll gefüllt wurde, positionierte man den Probenaschenkamm entlang der Oberkante der Kammer.

Kurz vor dem Austrocknen des auspolymerisierten Gels ( nach ca. 1 h ) wurde der Probenaschenkamm gezogen, ggf. überschüssiges Gel entfernt und der an der Unterseite der Kammer angebrachte Klebestreifen entfernt.

## Elektrophorese

Die fertiggestellte Gelkammer wurde in die Elektrophorese-Vorrichtung eingespannt, die Puffer-Vorratsbehälter mit 1×TBE-Puffer gefüllt und die Probenaschen ( mit einer geeigneten Spritze ) ausgespült. Von den PCR-Ansätzen versetzte man jeweils 5 µl mit 2,5 µl 'Loading-Buffer', füllte die gut durchmischten Lösungen in die Probenaschen, und legte dann ein elektrisches Feld von etwa 15 V/cm ( 500V / 33cm ) an. Die elektrophoretische Trennung wurde nach etwa 1,5 h unterbrochen, das Gel entnommen und unmittelbar weiterverarbeitet.

Nach Entfernung der silanisierten Glasplatte ( vorsichtig abhebeln ) legte man Chromatographie-Papier auf, drückte dieses gleichmäßig auf ( Walze ) und zog dann mit Hilfe des Papiers das Gel ( haftet wesentlich stärker am Papier ) von der zweiten Glasplatte.

Das Gel wurde dann mit der Papierseite nach unten ( ggf. zur Vermeidung eines "Durchschlagens" von Radioaktivität weiteres Papier unterlegen ) in die Trockenvorrichtung eingelegt, mit Folie ( gewöhnliche Haushalts-Folie ) überdeckt und unter Vakuum bei ca. 70°C so lange getrocknet, bis keine Feuchtigkeit mehr entwich ( vollständiges Gefrieren der Flüssigkeit in der Kühlfalle, ca. 30 min ).

#### 2.4.4.4 Daten-Dokumentation

Radiographien der entwickelten Gele wurde mit Hilfe des 'Phosphor Image'-Verfahrens erstellt. Die  $\beta$ -Strahlung des  $^{32}\text{P}$  regt dabei Elektronen in ein Elektronenniveau an, aus dem weder durch thermische Äquilibrierung, Fluoreszenz noch durch Phosphoreszenz eine Energieabgabe erfolgen kann. Damit akkumulieren sich auf diese Art und Weise angeregte Elektronen während der Exposition. Erst nach weiterer Anregung durch Lichteinstrahlung einer bestimmten Wellenlänge kann unter Fluoreszenz - bei deren Excitations-Wellenlänge dann gemessen wird - eine Rückkehr in Zustände niedrigeren Energieniveaus erfolgen ( "Auslesen" ). Durch intensive Lichteinstrahlung kann die Platte wieder vollständig in den Grundzustand versetzt werden ( "Löschen" ).

Die Methode weist einen extrem breiten linearen Bereich auf (  $>10^4$ , Daten nicht gezeigt ) und eignet sich somit besonders gut für exakte Quantifizierungen der Radioaktivität.

**Geräte :** Radiographie-Belichtungskassetten : Siemens, Erlangen ; 'Phosphor Image'-Platten 'BAS-III-S' : Fuji, Japan ; 'Phosphor Image'-Reader 'Fujifilm BAS 1500' : Fuji, Japan ; 'Phosphor Image'-Löschvorrichtung : Fuji, Japan

**Arbeitsprotokoll :** Eine frisch gelöschte 'Phosphor Image'-Platte wurde in einer Radiographie-Belichtungskassette 30min bis 48h exponiert ( Belichtungsschicht der Folienseite des Gels zugewandt, möglichst parallel positioniert ) und dann ausgelesen. Die erhaltenen Daten wurden im 'FujiBas'-Dateiformat abgespeichert.

## 2.5 Methoden der DNA-Rekombination

### 2.5.1 Fragmentierung, Trennung und Isolierung von DNA-Molekülen

#### 2.5.1.1 Fragmentierung von DNA-Molekülen mit Hilfe von Restriktions-Endonukleasen

Die Sequenz-spezifische Fragmentierung von doppelsträngigen DNA-Molekülen gelingt mit Hilfe von Restriktions-Endonukleasen. In Abhängigkeit von der Anwesenheit einer bestimmten Erkennungssequenz "schneiden" diese beide Stränge gegenüberliegend ( ergibt 'blunt ends' ) oder mit geringem Versatz ( ergibt 'sticky ends' mit 5'- oder 3'-Überhang ) zwischen 3'-O-Atom und Phosphatgruppe auf. Bei den fast ausschließlich verwendeten Restriktions-Endonukleasen des Typs II haben die Erkennungssequenzen und die sich innerhalb dieser Sequenz befindlichen Schnittstellen ein gemeinsames palindromisches Symmetriezentrum.

Für den praktischen Einsatz von Restriktions-Endonukleasen kann mit Hilfe eines "Verdaufaktors" die Enzymmenge ( angegeben als 'units' ) und die Reaktionszeit auf die zu fragmentierende DNA-Menge abgestimmt werden :

$$\text{Verdaufaktor} = \text{Zeit} / [\text{h}] \times \text{Enzym-Menge} / [\text{u}] \div \text{DNA-Menge} / [\mu\text{g}].$$

Durch entsprechende Einstellung dieses Faktors kann einerseits die vollständige Fragmentierung gewährleistet und andererseits die bei stark überschüssiger Enzymaktivität auftretende Spaltung der DNA an Sequenzen, die sich in einzelnen Basen von der Erkennungssequenz unterscheiden ( 'star activity' ), vermieden werden. Als günstig erwies sich in diesem Sinne ein Verdaufaktor von 8.

Die Reaktionen wurden im allgemeinen in den vom Hersteller empfohlenen mitgelieferten Puffersystemen durchgeführt. Mußte man aufgrund gleichzeitig oder nachfolgend durchzuführender Modifikationen ( z.B. "Doppelverdau" ) an der DNA Puffersysteme verwenden, die eine verminderte Enzymaktivität zur Folge hatten, wurde der Verdaufaktor entsprechend erhöht. Es wurde vermieden, den durch die Enzymlösung eingebrachten Glycerin-Gehalt auf über 10% anwachsen zu lassen.

Eine ggf. notwendige Inaktivierung der Restriktions-Endonukleasen konnte meist durch 15-minütiges Erhitzen des Ansatzes auf 65-75°C erreicht werden

### 2.5.1.2 Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

Die Trennung von DNA-Fragmenten wurde im allgemeinen in horizontalen Agarosegelen und 1×TAE-Puffer durchgeführt. Für präparative Zwecke setzte man 1 bis 1,5 cm dicke Gele aus 'Low-Melting-Point'-Agarose ein, für analytische Zwecke ca. 0,75 cm dicke Gele aus gewöhnlicher Agarose. Der Agarose-Gehalt und genaue Typ der Agarose richtete sich nach den zu trennenden Fragment-Längen ( vgl. Produktbeschreibung Biozym ).

Für analytische Zwecke wurde der Einsatz von ca. 200 ng DNA pro Bande angestrebt ( optimale Trennung bei hinreichender Sichtbarkeit ).

**Geräte :** horizontale Elektrophorese-Vorrichtung 'Modell H3' : Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein ; Spannungsversorgung 'Desatronic 6000/100' : Desaga, Heidelberg ; 'CSC-Chemolumineszenz-Kamera' : Raytest, Strauben ; UV-Fluoreszenz/Lumineszenz-Belichtungskammer 'TI 1', Biometra, Göttingen ; UV-Filter 'Nr.16' : Kodak, Stuttgart .

**Material :** 'Low-Melting-Point'-Agarosen : Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf ; Standard-Agarose : PeqLab, Erlangen ; Fragment-Standard '100bp DNA-Ladder' : PeqLab, Erlangen ; Ethidiumbromid : Serva, Heidelberg .

#### Puffer, Lösungen

	Komponente	Konzentr.	Bemerkung
Ethidiumbromid-Lsg.	Ethidiumbromid	1 mg/ml	
50×TAE-Puffer, pH 8,5	Tris	2,0 M	242g / 1,0l bei 121,1 g/mol
	EDTA	50 mM	18,6g / 1,0l bei 372,2 g/mol
	Essigsäure	pH 8,5	
Ladepuffer	Orange G	0,50 %	50mg / 10ml
	Saccharose	1,0 %	100mg / 10ml
	SDS	1,0 %	0,50ml 20%-ige SDS-Lösung / 10ml

EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure ( Dinatriumsalz Dihydrat ) .

**Arbeitsprotokoll :** Die abgewogene Agarose wurde unter Rühren im entsprechenden Volumen 1×TAE-Puffer gelöst, in der Mikrowelle aufgeköcht, kurz durchgerührt und nochmals aufgeköcht. Nachdem die Lösung unter Rühren auf ca. 55°C abgekühlt war, versetzte man diese mit Ethidiumbromid ( Endkonzentration analytisch 0,5 µg/ml, präparativ 0,2 µg/ml ) und goß sie in die Schablone. Nach 1 h wurde der Probenaschenkamm gezogen und die Elektrophorese-Kammer mit 1×TAE-Puffer aufgefüllt ( Füllhöhe mindestens 0,75 cm über der Geloberkante ).

Die Proben und die Fragment-Standards wurden mit 20% des Eigenvolumens mit Ladepuffer versetzt, aufgetragen und elektrophoretisch entwickelt, bis der Farbstoff des Ladepuffers die Hälfte des Gels erreichte.

**Dokumentation** : Das sich unter UV-Einstrahlung ( analytisch 260 nm, präparativ 380 nm ) ergebende Bandenmuster dokumentierte man mit Hilfe einer elektronischen Kamera mit UV-Filter.

### 2.5.1.3 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

**Geräte** : UV-Handleuchte 'NU-6-KL', Konrad Benda, Wiesloch

**Material** : Gelextraktionskit 'QiaQuick' : Qiagen, Hilden

#### Arbeitsprotokoll

Die durch langwellige UV-Bestrahlung ( 380 nm ) sichtbar gemachten Banden der für präparative Zwecke in "LowMeltingPoint"-Agarosegel elektrophoretisch getrennten DNA-Fragmente wurden zunächst unter Vermeidung längerer Strahlungsexposition ausgeschnitten. Im weiteren löste man mit Hilfe des 'QiaQuick'-Gelextraktions-Kits die Agarose in einem stark chaotropen Puffer ( QG-Puffer ) auf und isolierte dann absorptionschromatographisch die DNA ( in Eppendorf-Zentrifuge einzusetzende QuiQuick-Säule, Waschpuffer PE, Elutionspuffer EB ).

Die Gelstücke wurden dazu mit 3 µl QG-Puffer pro mg Agarose versetzt, unter wiederholtem Vortexen 10 min bei 50°C inkubiert, die sich ergebende Lösung mit 1 µl Isopropanol pro mg Agarose versetzt und dann auf die Säule aufgetragen. Durch Zentrifugieren ( bei  $>10.000\times g$  für 1 min ), Auftragen von 0,5 ml QG-Puffer und erneutes Zentrifugieren wurde dann die DNA auf der Säule gebunden und die gelöste Agarose mit dem Durchfluß verworfen. Durch Auftragen von 0,75 ml PE-Puffer, eine 1-minütige Inkubationszeit und einen dritten Zentrifugationsschritt löste man weitere Verunreinigungen an und wusch diese aus. Durch Entfernen des Durchflusses und Zentrifugieren wurden nun auch letzte Reste des Waschpuffers beseitigt und schließlich durch Auftragen von 30 µl EB-Puffer ( exakt in die Mitte der Säule ), 1-minütige Inkubationszeit und einen letzten Zentrifugationsschritt die DNA eluiert.

## 2.5.2 Quantifizierung von Polynukleotiden

### 2.5.2.1 Photometrische Bestimmung

Zur photometrischen Messung von Polynukleotiden ( bei 260 nm ) wurden diese grundsätzlich in  $0,02\times - 0,05\times TE$ -Puffer pH 8,5 gelöst ( der Absorptionskoeffizient von Polynukleotiden ist abhängig vom pH der Lösung, gleichzeitig würde aber bei zu hohen Puffer-Konzentrationen dessen Eigenabsorption seinerseits zur Fehlerquelle werden ). Im allgemeinen ergab sich diese Pufferstärke durch Verdünnung der in  $1\times TE$ -Puffer gelösten DNA-Stammlösungen ( 1,0-2,0 µg/µl ) auf meßtechnisch geeignete Konzentrationen ( 25-50 ng/µl ), ansonsten wurde eine entsprechende Meßlösung verwendet.

Die Polynukleotid-Konzentration wurde dann mit Hilfe folgender Absorptionskoeffizienten ( 1cm Strahlengänglänge eingerechnet ) bestimmt ( Sambrook J. et al., 1989 ) :

Polynukleotid-Typ	doppelsträngige DNA	RNA
Absorptionskoeffizient bei 260 nm	50 ng/(µl×OD)	40 ng/(µl×OD)

Die Sequenz-spezifischen Absorptionskoeffizienten einzelsträngiger DNA-Oligonukleotide ( Primer, Gelshift-Sonden ) wurden den beigelegten Datenblättern entnommen.

Die gewünschte Endkonzentration ( $c_{\text{End}}$ ) wurde anhand der gemessenen Ist-Konzentration ( $c_0$ ) der Lösung (Volumen  $V_0$ ) durch Auffüllen mit der entsprechenden Menge Lösungsmittel bzw. Puffer (Volumen  $V_+ = V_0 \times [c_0 / c_{\text{End}} - 1]$ ) eingestellt.

### 2.5.2.2 Bestimmung mittels Ethidiumbromid-Fluoreszenz

Für eine Bestimmung der Polynukleotid-Konzentration mittels Ethidiumbromid-Fluoreszenz wurde einerseits eine Verdünnungsreihe eines Standards und andererseits die zu messende Probe (im Falle einer völlig unbekanntem Konzentration ebenfalls in verschiedenen Verdünnungen) auf ein Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel aufgetragen und entwickelt. Ein Vergleich der Fluoreszenz-Intensität von Standard und Probe erlaubte dann die Abschätzung der in den aufgetragenen Probenlösungen enthaltenen Polynukleotidmengen.

Sinnvoll ist diese Methode einerseits für die Bestimmung von Lösungen sehr geringer Konzentration und andererseits zur Verifizierung bereits photometrisch ermittelter Konzentrationswerte.

Das Vorgehen entsprach dem bei gewöhnlichen analytischen Ethidiumbromid-Agarosegelen (vgl. 2.5.1.2; auf keinen Fall darf das Gel erst nach der elektrophoretischen Entwicklung mit Ethidiumbromid behandelt werden, es ergibt sich kein proportionaler Zusammenhang zwischen Menge und Fluoreszenz-Intensität; Daten nicht gezeigt). Allerdings wurde eine Ethidiumbromid-Konzentration im Gel von  $1 \mu\text{g/ml}$  verwendet, um so auch noch sehr verdünnte Lösungen messen zu können (Nachweisgrenze bei ca. 20 ng, entspricht bei einem maximalen Probenvolumen von  $20 \mu\text{l}$  einer Probenkonzentration von  $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ). Zirkuläre DNA muß vor der Messung linearisiert werden (vgl. Abb. 13B).

## 2.5.3 Vektor- bzw. Konstrukt-Vermehrung, Plasmid-Präparation

### 2.5.3.1 Bakterien-Zellstamm

Für die Vermehrung der Vektoren bzw. Konstrukte wurde der 'XL1Blue'-Stamm (Bullock W.O. et al., 1987) verwendet. Dessen Genotyp - *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 hsdR17 lac[F' proAB lac $\beta$ Z $\Delta$  M15 Tn10(Tet<sup>r</sup>)]* - weist neben den üblichen die Plasmid-Vermehrung begünstigenden Eigenschaften (Rekombinations-System *recA1*, Endonuklease *endA1*, regulatorisches Gen *relA1*) und Selektionsgenen (*gyrA96*, *thi-1*, *proAB*, *Tn10*) Mutationen im Restriktions-System auf (*hsdR17*), die auch eine Vermehrung nicht methylierter Plasmide erlauben (Abwesenheit der Restriktions-Endonuklease *EcoK*, die bei nicht methylierter Zielsequenz DNA spaltet).

**Material** : 'Epicurian Coli XL1-Blue Competent Cells' : Stratagene, La Jolla (USA).

### 2.5.3.2 Allgemein verwendete Medien und Lösungen

	Komponente	Konz.	Bemerkung
LB-Medium / Agar-Platten	Bactotrypton	10 g/l	Becton Dickinson, Heidelberg
	Yeast Extract	5 g/l	Becton Dickinson, Heidelberg
	NaCl	10 g/l	
	NaOH	pH 7,0	
	Agar	1,5 %	Becton Dickinson, Heidelberg ; nur für Agar-Platten
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad	autoklavieren, auf ca. 50°C abkühlen lassen
	Antibiotikum		mit Stammlösung (s.u.) versetzen, mischen für Agar-Platten : noch heiß unter keimarmen Bedingungen in 25ml-Port. in Petrischalen gießen, erstarren lassen

2M Mg <sup>2+</sup> -Lösung	MgCl <sub>2</sub>	1,0 M	2,03g MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O / 10ml bei 203 g/mol
	MgSO <sub>4</sub>	1,0 M	2,46g MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O / 10ml bei 246 g/mol
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad	filtersterilisieren durch 0,22µm-Membran, lagern bei 4°C in 750µl-Aliquoten
2M Glc-Lösung	D-Glucose	2,0 M	1,98 g D-Glucose-Monohydrat / 5ml bei 198 g/mol
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad	filtersterilisieren durch 0,22µm-Membran, lagern bei -20°C in 600µl-Aliquoten

### 2.5.3.3 Anzucht von Bakterien-Zellen

**Geräte :** Bakterien-Brutschrank : Heraeus Instruments, Hanau .

#### Arbeitsprotokoll :

Aus der die Stamm-Zellen bzw. Transformanten enthaltenden Suspension wurden ( über eine Verdünnungsreihe in LB-Medium ) sich mindestens über 3 Größenordnungen erstreckende Anteile der Zellaufschlämmung auf Agarplatten ausplattiert ( mit Drigalski-Spatel, in Volumina zwischen 50 und 200 µl ). Die Agarplatten inkubierte man daraufhin ( umgekehrt ) 20-24 h bei 37°C ( die Kolonien sollten auf einen Durchmesser von 1-2 mm anwachsen ). Die Platten wurden dann bis zur weiteren Verwendung seitlich mit Parafilm verschlossen bei 0-4°C eingelagert.

### 2.5.3.4 Herstellung kompetenter Zellen - Allgemeines

Selektionsmedium für den verwendeten 'XL1-Blue'-Stamm war Tetracyclin, das man Agarplatten und allen Kultur-Medien entsprechend einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugab. Für die Anzucht wurde zunächst eine Suspension der zu verwendenden Stammzellen ausplattiert ( s.o., Verdünnungsreihe 10<sup>-11</sup> - 10<sup>-15</sup> µl pro Platte ) und dann zur Vorvermehrung 5 ml Medium in einem Kulturröhrchen mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und ca. 8 h im Schüttler bei ca. 250 rpm und 37°C inkubiert.

**Geräte :** Bakterien-schüttler : Infors AG, Bottmingen ( Schweiz ) .

#### Material

	Komponente	Konzentr.	Bemerkung
Tetracyclin-Lsg.	Tetracyclin	5,0 mg/ml	Sigma-Aldrich, St.Louis ( USA ) ; in Ethanol ; auf 50°C erwärmen und vortexen bis zur vollständigen Auflösung

### 2.5.3.5 Herstellung kompetenter Zellen nach Hanahan

Diese Methode ( Hanahan D., 1985 ) führt relativ schnell zu Bakterienzellen mit einer - für die Vermehrung von aufgereinigten Vektoren und Produkten unproblematischer Ligationen ausreichenden - Transformationseffizienz von ca. 1×10<sup>6</sup> - 1×10<sup>7</sup> Kolonie-formender Einheiten ( cfu, colony-forming units ; Daten nicht gezeigt ) pro µg DNA.

#### Medien, Puffer

	Komponente	Konzentr.	Bemerkung
SOB-Medium	LB-Medium		130ml ; autoklaviert
	1M MgCl <sub>2</sub>	10 mM	
	1M MgSO <sub>4</sub>	10 mM	1,3ml filtersterilisierte 2M Mg <sup>2+</sup> -Lsg. / 130ml

RF1-Puffer	RbCl	100 mM	2,42g / 200ml bei 120,9 g/mol
	MnCl <sub>2</sub>	50 mM	1,98g / 200ml bei 197,91 g/mol
	KAc	30 mM	0,589g / 200ml bei 98,15 g/mol
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM	0,294g / 200ml bei 147,0 g/mol
	HAc	pH 5,8	
	Glycerin	15 % (w/v)	23,8ml / 200ml bei 1,26 g/ml
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad	200ml ; filtersterilisieren durch 0,22µm-Membran
RF2-Puffer	MOPS	10 mM	105mg / 50ml bei 209,3 g/mol
	RbCl	10 mM	60,5mg / 50ml bei 120,9 g/mol
	CaCl <sub>2</sub>	75 mM	551mg / 50ml bei 147,0 g/mol
	NaOH	pH 6,8	
	Glycerin	15 % (w/v)	5,95 ml bei 1,26 g/ml
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad	50ml ; filtersterilisieren durch 0,22µm-Membran

MOPS = 3-Morpholino-propansulfonsäure, Glycerin ( für Molekularbiologie ) : Sigma-Aldrich, St.Louis USA .

### Arbeitsprotokoll

125 ml SOB-Medium in einem Schikanekolben wurden mit 125 µl der Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 250 rpm im Schüttler so lange inkubiert, bis 20-25 % der maximalen Zelldichte erreicht wurden ( ca. 16 h, meßbar anhand der OD bei 600nm, wobei die Maximaldichte bei den meisten Photometern einem Wert von 1,8-2,0 OD<sub>600nm</sub> entspricht ).

Nachdem man die erhaltene Zell-Suspension in 50ml-Zentrifugenröhrchen 15 min auf Eis gestellt hatte, wurde diese 15 min bei 1000×g und 4°C zentrifugiert und der Überstand sorgfältig abgesaugt. Das Pellet resuspendierte man nun in 40 ml eiskaltem RF1-Puffer, inkubierte nochmals 20 min auf Eis und pelletierte erneut bei 4°C mit 1000 g. Jetzt wurde in 10 ml RF2-Puffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Ggf. konnten nun Anteile der Zell-Suspension direkt für eine Transformation eingesetzt werden, für eine spätere Verwendung wurden 320µl-Aliquote in Kryoröhrchen abgefüllt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C eingelagert.

### 2.5.3.6 Herstellung kompetenter Zellen nach Inoue

Die Methode nach Inoue ( Inoue H. et al., 1990 ) führt zu sehr hohen Transformationseffizienzen von über  $1 \times 10^8$  Kolonie-formender Einheiten pro µg DNA ( Daten nicht gezeigt ), die sich insbesondere in Verbindung mit problematischen Ligationen vorteilhaft auswirken. Aufgrund der Vermehrung bei relativ tiefen Temperaturen muß bei diesem Schritt allerdings mit 2-3 Tagen Inkubationszeit gerechnet werden.

### Medium, Puffer

	Komponente	Konz.	Bemerkung	
SOB-Medium	Bactotryptone	20 g/l	5,0g / 250ml ; Becton Dickinson, Heidelberg	
	Yeast Extract	5,0 g/l	1,25g / 250ml ; Becton Dickinson, Heidelberg	
	NaCl	10 mM	146mg / 250ml bei 58,44 g/mol	
	KCl	2,5 mM	46,6mg / 250ml bei 74,56 g/mol	
	NaOH	pH 7,0		
				autoklavieren
		MgCl <sub>2</sub>	10 mM	2,5ml 2M filtersterilisierte Mg <sup>2</sup> -Lsg. / 250ml
	MgSO <sub>4</sub>	10 mM		

TB-Puffer	PIPES	10 mM	302mg / 100ml bei 302,4 g/mol
	CaCl <sub>2</sub>	15 mM	221mg / 100ml bei 147,0 g/mol
	KCl	250 mM	1,86g / 100ml bei 74,56 g/mol
	KOH	pH 6,7	
	MnCl <sub>2</sub>	55 mM	890mg / 100ml bei 161,9 g/mol

PIPES = Piperazin-2,4-bis(2-ethansulfonsäure) : Sigma-Aldrich, St.Louis USA .

### Arbeitsprotokoll

250 ml SOB-Medium in einem Schikanekolben wurden mit 5 ml der Vorkultur angeimpft und so lange bei 18°C ( Schüttler im Kühlraum ) und 250 rpm inkubiert, bis ca. 30% der maximalen Zelldichte erreicht wurden ( Messung anhand OD<sub>600nm</sub>, s.o. ; bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Vermehrung ergab sich eine Inkubationszeit von 48 h mit einer Verdoppelung der Zelldichte etwa alle 10 h ).

Die Bakterien stellte man dann 10 min auf Eis, pelletierte 10 min mit 2500×g bei 4°C ( Überstand gründlich absaugen ) und resuspendierte vorsichtig in 80 ml eiskaltem TB-Puffer. Es wurde nun erneut 10 min auf Eis gestellt, wie oben pelletiert und in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Zur Suspension gab man schließlich DMSO entsprechend einer Endkonzentration von 7% ( 1,51 ml ), stellte nochmals 10 min auf Eis, füllte 1ml-Aliquote in Kryoröhrchen, fro diese in flüssigem Stickstoff ein und lagerte sie im Stickstofftank.

### 2.5.3.7 Transformation

Das folgende Protokoll stellt eine geringfügige Modifikation der in der Produktbeschreibung der 'Epicurian Coli XL1-Blue' aufgeführten Arbeitsanweisung dar.

#### Medien, Lösungen

	Komponente	Konz.	Bemerkung
SOC-Medium	LB-Medium		50ml ; autoklaviert
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM	500µl filtersterilisierte 2M Mg <sup>2+</sup> -Lsg. / 50ml
	MgSO <sub>4</sub>	10 mM	
	D-Glucose	20 mM	500µl filtersterilisierte 2M Glucose-Lsg. / 50ml
β-Mercaptoethanol-Lösung	β-Mercaptoethanol	10% ( v/v )	5µl / 50µl ; in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ; frisch herstellen
Ampicillin-Stammlsg.	Ampicillin	50 mg/ml	in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ; bei -20°C in 1,0ml-Aliquoten lagern

β-Mercaptoethanol ( für Molekularbiologie ), Ampicillin ( Natriumsalz ) : Sigma-Aldrich, St.Louis USA .

### Arbeitsprotokoll

Bei allen vorbereitenden und folgenden Arbeitsschritten wurde so keimarm wie möglich gearbeitet. Bis zur Durchführung des Hitzeschocks verwendete man außerdem ausschließlich gründlich vorgekühlte Pipettenspitzen, Gefäße und Lösungen und es wurde nur durch vorsichtiges "Schnippen" am Gefäß oder sanftes Auf- und Abpipettieren aufgeschlämmt bzw. gemischt.

- Äquilibrierung** : Man verteilte zunächst die Zell-Suspension - ggf. nachdem diese auf Eis aufgetaut wurde - in 100µl-Aliquoten auf 15ml-Falcon-Zentrifugenröhrchen, versetzte jeweils mit 1,7 µl der β-Mercaptoethanol-Lösung ( Endkonzentration 25 mM ) und inkubierte weitere 10 min unter regelmäßigem Aufschlämmen ( ca. alle 2 min ) auf Eis.
- DNA-Vorinkubation** : Die Bakterien wurden dann mit DNA ( in einem Volumen von 2-2,5 µl, s.u. ) versetzt, aufgeschlämmt und 30 min auf Eis inkubiert.
- Hitzeschock** : Nun tauchte man die Zentrifugenröhrchen exakt 45 s in ein 42°C-Wasserbad und stellte diese sofort wieder auf Eis.

4. **Erholungsphase** : Nach 2 min wurde zur Suspension 900 µl auf 42°C temperiertes SOC-Medium gegeben und die Zellen exakt 1 h bei 37°C und 250 rpm im Schüttler inkubiert.
5. **Anzucht** : Transformanten wurden dann wie in 2.5.3.3 beschrieben ausplattiert, angezogen und gelagert. Selektions-Antibiotikum war im allgemeinen Ampicillin, das dementsprechend in einer Konzentration von 100 µg/ml in den Agarplatten enthalten war.

Die für eine Transformation eingesetzte DNA-Menge wurde entsprechend der Transformationseffizienz ( im Rahmen dieser Arbeit nach Hanahan  $1 \times 10^7$ , nach Inoue  $1 \times 10^8$  cfu/µg ) nach

$$\text{DNA-Menge} / [ \mu\text{g} ] = \frac{\text{Anzahl gewünschter Kolonien} / [ \text{cfu} ]}{\text{Transformationseffizienz} / [ \text{cfu} / \mu\text{g} ]}$$

so eingestellt, daß bei aufgereinigten Vektoren 200 und bei Ligationsprodukten  $2 \times 10^6$  Kolonie-formende Einheiten im Gesamtansatz zu erwarten waren. Im ersten Fall wurden dann 5, 50 und 500 µl, ( theoretisch mit 1 Kolonie pro 5 µl ), im zweiten 0,5, 5, 50 und  $2 \times 450$  µl ( bei einer "Ligations-Ausbeute" von 10% theoretisch 10 Kolonien pro 0,5 µl ) ausplattiert. Diese Vorgehensweise trug dem Umstand Rechnung, daß bei Ligationsprodukten der Anteil tatsächlich transformierender Moleküle maximal bei 10%, oft jedoch Größenordnungen tiefer liegt.

### 2.5.3.8 Vermehrung transformierter Bakterien ( Plasmid-Vermehrung )

Für die Vermehrung von transformierten Bakterien verwendete man das Zellmaterial einer Kolonie zum Animpfen von 250 ml LB-Medium in einem Schikanekolben, welches dann für 16-20 h ( bis zum Erreichen der Maximaldichte ) bei 37°C und ca. 250 rpm im Schüttler inkubiert wurde.

Durch Zentrifugation für 15 min bei  $1000 \times g$  ( bzw. 8 min bei  $2000 \times g$  ) pelletierte man nun einerseits für die Analyse des enthaltenen Plasmids ( Plasmid-Minipräparation ) ein 5ml-Aliquot in einem 15ml-Zentrifugenröhrchen und andererseits sukzessive das restliche Volumen in einem 50ml-Zentrifugenröhrchen, um ggf. größere Mengen des Plasmids isolieren zu können ( Plasmid-Maxipräparation ). Die gründlich vom Überstand befreiten Zellpellets wurden dann ggf. bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert ( auch über Monate möglich ).

Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da oft relativ große Plasmide vermehrt werden mußten und sich dementsprechend ein erheblicher Selektionsdruck hin zu Deletionsmutanten ergab. Durch das direkte Animpfen konnte die notwendige Generationszahl minimiert werden und durch das Entnehmen des Analyse-Aliquots aus dem Großansatz sichergestellt werden, daß das zunächst analysierte 5-ml Aliquot tatsächlich den Großansatz repräsentierte.

### 2.5.3.9 Plasmid-Präparation

Bei den beiden zur Plasmid-Präparation verwendeten Protokollen wurden die Bakterienzellen zunächst im Alkalischen ( Denaturierung von Protein ) lysiert ( durch Detergenz SDS ) und gleichzeitig RNA durch RNase A degradiert. Bei der Neutralisation der Lösung fiel in Detergenz-Salz-Komplexen gebundenes denaturiertes Protein aus, chromosomale DNA wurde aufgrund ihrer Verankerung mit Proteinen der Zellmembran und ihrer Größe kopräzipitiert. Plasmid-DNA renaturierte infolge ihrer kovalent stabilisierten Struktur und verblieb dadurch in Lösung. Sie wurde nun auf einem Anionen-Austauscher gebunden, von Verunreinigungen befreit ( u.a. abgebaute RNA, DNA-bindende und sonstige in Lösung verbliebene Proteine, durch den Alkoholanteil des Waschpuffers auch unspezifisch hydrophob Gebundenes ) und eluiert. Durch eine abschließende Alkoholpräzipitation wurde entsalzt und in einem geeigneten Puffer gelöst.

Da bei dem Verfahren Fragmente chromosomaler DNA zu einem gewissen Anteil in Lösung verbleiben würden und sich diese chromatographisch nicht von Plasmid-DNA unterscheiden, mußten Scherkräfte strikt vermieden werden. Man mischte dementsprechend nur durch vorsichtiges mehrmaliges Wenden der verschlossenen Gefäße ( auf keinen Fall vortexen ).

### Material

'Qiagen Plasmid Mini Kit' ( Mini-Präparation ), 'Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit' ( Maxipräparation ) : Qiagen, Hilden ; darin enthaltene Lösungen :

P1 ( Resuspension ) :	50 mM TrisHCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
P2 ( Zell-Lyse ) :	200 mM NaOH, 1 % SDS
P3 ( Neutralisation ) :	3,0 M Kaliumacetat pH 5,5
ER :	( Komplexierung von Endotoxinen )
QBT ( Äquilibrierung ) :	750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % Isopropanol, 0,15 % Triton X-100
QC ( Waschen ) :	1,0 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % Isopropanol
QF ( Elution ) :	1,25 M NaCl, 50 mM TrisHCl pH 8,5, 15 % Isopropanol
QN ( Elution ) :	1,6 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % Isopropanol
TE :	10 mM TrisHCl pH 8,0, 1 mM EDTA

### Minipräparation

Das ggf. zunächst aufzutauende Zellpellet wurde vollständig in 0,3 ml P1-Puffer resuspendiert, mit 0,3 ml P2-Lösung versetzt, durch 6-maliges Wenden gemischt und exakt 5 min bei ca. 20°C inkubiert. Danach gab man 0,3 ml eiskalten P3-Puffer zu, mischte wie oben, inkubierte 5 min auf Eis, mischte wieder und zentrifugierte 10 min bei ca. 20°C und mindestens 12.000 g.

Man gab nun den klaren Überstand ( ggf. nochmals zentrifugieren ) auf die zuvor mit 1 ml QBT-Lösung äquilibrierte Anionenaustauscher-Säule, wusch 4 Mal mit je 1 ml QC-Puffer und eluierte mit 0,8 ml QF-Lösung.

Nach Mischen des Eluats mit 0,7 Volumenanteilen 20°C warmen Isopropanols ( 0,56 ml ) wurde 30 min bei 4°C und mindestens 12000×g zentrifugiert, das DNA-Pellet mit 1 ml 70%-igen Ethanol gewaschen ( Überstand vorsichtigst absaugen, Waschlösung zugeben, 15 min wie oben zentrifugieren ), schließlich gründlich von Überstand befreit, maximal 5 min an der Luft getrocknet und in 20 µl TE-Puffer gelöst.

### Maxipräparation

Im Gegensatz zur Minipräparation bewerkstelligte man bei diesem Protokoll das Abtrennen des bei der Neutralisation des Lysats entstehenden Präzipitats nicht durch Zentrifugation, sondern durch die Filtration durch ein Molekularsieb. Die zusätzliche Inkubation des sich ergebenden Durchflusses mit ER-Puffer ermöglichte es außerdem, die Präparation im Zuge der folgenden chromatographischen Aufreinigung weitgehend von Endotoxinen zu befreien. ( Die in der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien in großen Mengen enthaltenen Endotoxine, auch Lipopolysaccharide genannt, können in eukaryotischen Zellen zu Reaktionen des angeborenen Immunsystems führen und so u.a. mittelbar die Transfektionsausbeuten deutlich beeinträchtigen ).

Wie beschrieben resuspendierte und lysierte man mit 10 ml P1 und 10 ml P2. Nach Versatz mit 10 ml eiskaltem P3-Puffer und Mischen durch 10-maliges Wenden wurde nun der Ansatz sofort in eine Filtereinheit mit verschlossenem Auslaß überführt und dort 10 min ( bei zögerlicher Bildung des Präzipitats auch länger ) bei 20°C belassen. Nach Öffnen des Auslasses wurde dann mit Hilfe eines Stempels der flüssige Anteil des Inhalts durch ein im Boden der Filtereinheit eingearbeitetes Molekularsieb passiert. Die Lösung versetzte man jetzt mit 2,5 ml ER-Puffer und inkubierte 30 min auf Eis.

Der Minipräparation entsprechend wurde nun säulenchromatographisch aufgereinigt und über eine Alkohol-Präzipitation entsalzt. Man äquilibrierte dabei mit 10 ml QBT-Puffer, wusch

2 Mal mit je 30 ml QC-Lösung und eluierte mit 15 ml QN-Puffer. Wieder wurde das Eluat mit 0,7 Volumenanteilen ( 10,5 ml ) ca. 20°C warmen Isopropanols versetzt und 30 min bei 4°C und jetzt mindestens 15.000×g zentrifugiert. Man wusch das Pellet mit 2,5 ml 70%-igen Ethanols ( 15 min zentrifugieren wie oben ), trocknete maximal 10 min an der Luft und nahm in 200 µl TE-Puffer auf. Die Lösung wurde schließlich nach photometrischer Bestimmung der DNA-Konzentration ( 5-fach-Bestimmung bei Maxi-Präparation ) mit TE-Puffer auf eine Endkonzentration von 0,5 ( Mini-Präparation ) bzw. 2,0 µg/µl ( Maxi-Präparation ) eingestellt.

### 2.5.4 'blunt end'-Generierung

Mit Restriktions-Endonukleasen generierte 'sticky ends' können mit Hilfe des 'Klenow-Fragments' in 'blunt ends' umgewandelt werden. Man erhält es durch proteolytische Abspaltung eines N-terminalen kleineren Teils der DNA-Polymerase I, wodurch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität eliminiert wird, die ( 5'-3'- ) Polymerase- und die für das "Proofreading" verantwortliche 3'-5'-Exonuklease-Aktivität aber erhalten bleiben ( deren katalytische Zentren sich - aus funktionellen Gründen notwendigerweise - in enger Nachbarschaft befinden ). Bei ausreichender Versorgung mit dNTPs dienen 5'-Überhänge als Matrize für die Verlängerung des Gegenstrangs durch die Polymerase, 3'-Überhänge werden dahingegen durch die verbliebene Exonuklease-Aktivität bis zum Beginn des Gegenstrangs ( bei ungenügender Versorgung mit dNTPs auch darüber hinaus ) abgespalten.

Gleiche katalytische Aktivitäten weist auch die 'T4-DNA-Polymerase' auf. Sie wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet, da sie eine größere Toleranz gegenüber unterschiedlichen Puffer-Bedingungen besitzt und deshalb direkt ( ohne "Umpufferung" ) nach dem "Verdau" von DNA mit Restriktions-Endonukleasen eingesetzt werden konnte.

**Material :** 'T4 DNA Polymerase'-Kit : Promega, Madison USA ; 'Albumin (BSA)' ( für Molekularbiologie ) : Roche Molecular Biochemicals, Mannheim ; 'suRe/Cut Buffer A' : Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

**Lösungen :** dNTP-Mix je 1,0mM : vgl. 2.4.3, 1:10 verdünnen ; BSA-Lösung 1,0 mg/ml .

#### Arbeitsprotokoll

1. 5 µg DNA in einem Volumen von 30 µl wurden mit so viel 'suRe/Cut Buffer A ( 0,33M Trisacetat, 0,66M Kaliumacetat, pH7,9, 0,10M Magnesiumacetat, 5,0mM Dithiothreitol ), BSA-Lösung, dNTP-Mix und H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> zu einem Endvolumen von 58 µl versetzt, daß in einem Endvolumen von 60µl die Konzentrationen der Komponenten folgender optimaler Zusammensetzung möglichst nahe kamen : 33mM Trisacetat, 66mM Kaliumacetat pH7,9, 10mM Magnesiumacetat, 0,5mM Dithiothreitol, 0,1mM dNTP ( je ) und 100 ng/µl BSA.
2. Der Lösung gab man 20 units T4-DNA-Polymerase ( ca. 2 µl ) zu und inkubierte 5 min ( keinesfalls länger ) bei 37°C.
3. Um die Polymerase und die in der Ausgangslösung enthaltenen Restriktions-Endonukleasen zu inaktivieren, wurde abschließend 15 min bei 75°C inkubiert.

### 2.5.5 Dephosphorylierung

Soll eine Sequenz in einen Vektor ligiert werden, kann unter Umständen die Religation oder "Aneinanderreihung" ( 'Concatemerisierung' ) des Vektors - als konkurrierende Nebenreaktionen - stark in den Vordergrund treten. Eine Möglichkeit, dies wirksam zu verhindern, besteht in der Dephosphorylierung des Vektors. Dabei werden 5'-terminale Phosphatgruppen

der Vektor-Einzelstränge durch eine alkalische Phosphatase abgespalten und stehen damit für eine Ligation nicht mehr zur Verfügung. An den Ligations-Stellen betrifft dies bei einer Religation oder Concatemerisierung des Vektors beide Stränge - eine kovalente Verbindung kann also nicht zustande kommen ; bei einer Ligation eines 'Inserts' in einen Vektor jedoch immer nur einen der beiden Stränge. In letzterem Fall werden nach der Transformation des sich ergebenden Konstrukts die verbliebenen "Einzelstrang-Brüche" von Reparatur-Systemen der Bakterienzelle beseitigt.

Für diesen Zweck verwendet wurde im Rahmen dieser Arbeit die 'Shrimp alkalische Phosphatase', die im Gegensatz zu anderen gebräuchlichen alkalischen Phosphatasen durch eine 15-minütige Erhitzung auf 65°C vollständig und irreversibel inaktiviert werden kann. Den sich ergebenden Ansatz mit dephosphoryliertem Vektor kann man deshalb ohne weitere Aufreinigungsschritte für die Ligation einsetzen.

**Material :** 'Shrimp alkalische Phosphatase' ( enthaltene Komponenten : Enzym, Dephosphorylierungspuffer ) : Roche Molecular Biochemicals, Mannheim ;

### Arbeitsprotokoll

1. 100-200ng Vektor-DNA ( direkt aus "Restriktions-Verdau", nach Hitzeinaktivierung der Endonukleasen ), 0,8µl 10×Dephosphorylierungspuffer und H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> zu einem Endvolumen von 7,0µl wurden in ein Eppendorfcup vorgelegt.
2. Die Lösung wurde mit 1,0µl 'Shrimp alkalische Phosphatase' versetzt und dann 10min - für 'sticky-end'-Dephosphorylierungen - bzw. 60 min - für 'blunt-end'-Dephosphorylierungen - bei 37°C inkubiert.
3. Die Phosphatase wurde abschließend durch eine 15-minütige Erhitzung auf 65°C inaktiviert.

## 2.5.6 Ligation

Ligationen werden im allgemeinen mit Hilfe der T4-DNA-Ligase durchgeführt, die - bei einem Temperatur-Optimum von ca. 25°C - sowohl bei Einzel- als auch Doppelstrang-Brüchen 5'-terminale Phosphatgruppen mit benachbarten 3'-OH-Gruppen verknüpfen kann. Die zu verbindenden Enden von DNA-Doppelsträngen, die bei der DNA-Rekombination allenfalls 3-4 Nukleotide "Überhang" aufweisen, hybridisieren jedoch erst bei Temperaturen deutlich unter 25°C. Bei Auswahl einer zu hohen Ligations-Temperatur ist damit die Wärmebewegung zu hoch, um die gewünschte Aneinanderlagerung der Doppelstrang-Enden zu erlauben, bei Auswahl einer zu tiefen Temperatur wird auf der anderen Seite unnötigerweise das Auftreten von Nebenreaktionen - wie z.B. die unvollständige oder fehlgepaarte Überlagerung von 'sticky-ends' - begünstigt und die Enzymaktivität erniedrigt.

Eine einfache Möglichkeit, diese Problematik zu umgehen, besteht darin, anstatt einer festen Ligations-Temperatur einen Temperatur-Gradienten einzusetzen. Dieser erreicht ausgehend von einer zu hohen Temperatur bei sehr langsamer Erniedrigung schließlich die Temperatur, bei der die gewünschte Anlagerung ( maximale Basenpaarung ) gerade erfolgen kann und die für diese Verknüpfung höchste Enzymaktivität zur Verfügung steht. Bei weiterer Erniedrigung der Temperatur sollte dann für Nebenreaktionen kein Substrat mehr zur Verfügung stehen.

Prinzipien und Parameter verschiedener Vorschriften zur Durchführung von Ligationen ( Sambrook J. et al., 1989 ; Produktbeschreibung des 'Rapid DNA Ligation'-Kits, s.u. ) wurden zusammen mit den oben aufgeführten Überlegungen zu folgendem Arbeitsprotokoll zusammengefaßt.

**Material :** 'Rapid DNA Ligation Kit' ( u.a. enthaltene Komponenten : T4 DNA Ligase 5u/μl, 2×Ligations-Puffer ) : Roche Molecular Biochemicals, Mannheim.

### Berechnung der einzusetzenden Vektor- und Insert-Mengen

Für die Ligations-Reaktion setzte man insgesamt 200 ng DNA ein, wobei für den Fall, daß ein 'Insert' in einen Vektor einkloniert werden sollte, die Insert:Vektor-Stoffmengen-Verhältnisse auf Werte zwischen 1 ( Insert:Vektor 1:1 ) und 2 ( Insert:Vektor 2:1 ) eingestellt wurden ( vgl. 2.6 ). Für die einzusetzenden Massen ergab sich dann :

$$\text{Vektor-Menge} = 200 \text{ ng} \div \left( 1 + \frac{\text{Stoffmengen-Verhältnis} \times \text{Insert-Länge} / [ \text{bp} ]}{\text{Vektor-Länge} / [ \text{bp} ]} \right)$$

$$\text{Insert-Menge} = 200 \text{ ng} \div \left( 1 + \frac{\text{Vektor-Länge} / [ \text{bp} ]}{\text{Stoffmengen-Verhältnis} \times \text{Insert-Länge} / [ \text{bp} ]} \right)$$

### Arbeitsprotokoll

1. Vektor und Insert wurden in den errechneten Mengen in ein 100μl-PCR-Cup gegeben, auf ein Volumen von 10,5 μl aufgefüllt, 5 min auf 45°C erwärmt und dann schnell auf 4°C abgekühlt ( PCR-Thermocycler ).
2. Die Lösung versetzte man nun mit eisgekühlten 12,5 μl 2×Ligationspuffer und 2,0 μl der T4 DNA Ligase, ließ schnell auf 20°C erwärmen und dann mit einem Temperaturgradienten von -0,5°C / 30min innerhalb von 16 Stunden auf 4°C herunterkühlen.
3. Die erhaltenen Konstrukte wurden nach Möglichkeit direkt transformiert, ggf. über wenige Tage bei 4°C gelagert und nur für eine längerfristige Lagerung bei -20°C eingefroren.

## 2.6 Konstrukt-Erstellung

### 2.6.1 Einleitung

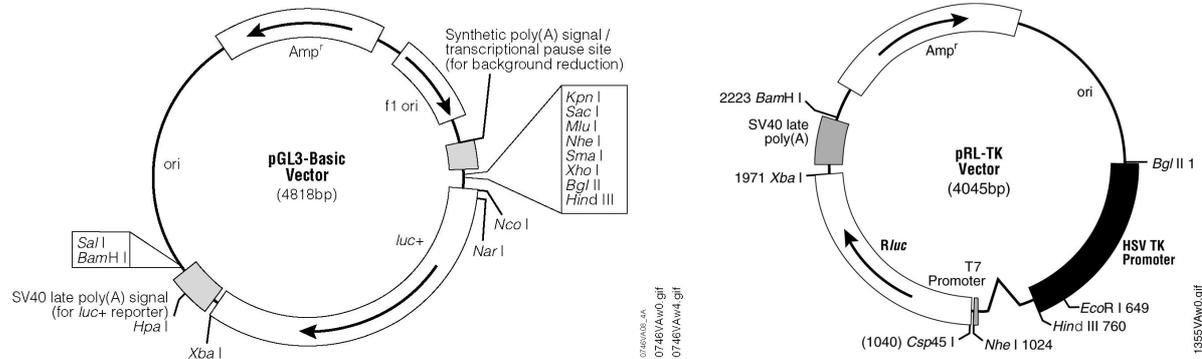
Für eine Untersuchung der transkriptionellen Regulation der UGT1A6 sollte eine Reporter-genanalyse ( vgl. 2.8 ) durchgeführt werden. Aufgrund der nur moderaten Effekte bei der Induktion der UGT1A6 durch monofunktionale Induktoren war dabei ein Reporter-gen-System mit hoher Präzision Voraussetzung für den Erhalt aussagekräftiger Ergebnisse. Vorversuche mit bereits vorhandenen Konstrukten - die als Reporter-gen die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase ( CAT ) verwendeten - zeigten, daß dieses System diese Anforderung nicht erfüllen konnte ( Daten nicht gezeigt ).

Aus verschiedenen Gründen präzisere ( und weniger arbeitsaufwendige ) Reporter-gen-Systeme verwenden die Firefly-Luciferase als Reporter-gen. Die als Cosmid-Vektor verfügbare regulatorische Sequenz der UGT1A6 sollte deshalb zunächst in einen dementsprechenden Reporter-gen-Vektor ( Abb. 10 ) einkloniert werden und das zu erhaltende Konstrukt nach Möglichkeit folgende Eigenschaften aufweisen : 1.) den nativen Verhältnissen entsprechender Abstand zwischen Promotor und codierender Sequenz ; 2.) Einklonierung eines möglichst großen Anteils des verfügbaren 5'-terminalen Bereichs des UGT1A6-Strukturgens ; 3.) Erstellung von Deletionsmutanten durch einfachen "Verdau" mit Restriktions-Endonukleasen und Religation.

Die Verwendung bereits vorhandener Zielsequenzen von Restriktions-Endonukleasen für das Einklonieren in den Reporter-genvektor hätte zum Erreichen dieser Anforderungen zu weitgehende Einschränkungen auferlegt. Deshalb sollten in einem ersten Schritt mit Hilfe einer präparativen PCR geeignete Zielsequenzen eingeführt, dann diese Zielsequenzen mit Restriktions-Endonukleasen im PCR-Produkt und im Reporter-gen-Vektor geschnitten und

schließlich ligiert werden. Die durch die Einführung von Zielsequenzen mittels präparativer PCR gewonnene Flexibilität konnte außerdem dazu genutzt werden, eine "gerichtete" Ligation durchzuführen, die aufgrund der Verwendung zweier verschiedener Endonukleasen an 5'- und 3'-Terminus der einzuklonierenden Sequenz bereits deren Orientierung im Vektor festlegt.

**Material :** 'pGL3-Basic Vector' : Promega, Madison ( USA ) ; 'pRL-TK-Vector' : Promega, Madison ( USA )



**Abb. 10 :** Für die Erstellung der verschiedenen Konstrukte verwendete Vektoren. Links der Basis-Reportergenvektor pGL3 mit dem Gen der Firefly-Luciferase. Rechts der Bezugs-Reportergenvektor mit dem Gen der Renilla-Luciferase und dem Promotor des Thymidinkinase-Gens des Herpes Simplex Virus.

**Identifizierung :** pGL3 : vgl. Abb. 12 ; pRL-TK, BbvI : 862, 620, 453, 387, 307, 216, 206, 86, 32, 18, 3 bp ; pRL-TK, NciI : 2032, 696, 671, 351, 129, 89, 76, 1 bp

## 2.6.2 UGT1A6Luc-2981-Konstrukt

### 2.6.2.1 Primer

pGL3	-<<<<- SacI --\/-- SmaI v Pos.: -32 >ggtagcgagctctacgcggtgctagcccgggctcgagatctgagatctaaagtaagcttggcattcc<> ->>>>- Asp718 ->>>>- BglIII ->>>>- HindIII
Primer	->>>>- BglIII HindIII ->>>>- >GCatgTAcAgatctgggcccagagcattctgacttc<> <ggatcctcgggacactaaacctctcactttCgAaaataatggc< \_72,4°C \_68,0°C / \_68,0°C / \_72,5°C /
UGT1A6	>cgatggacggatctgggcccagagcattctgacttctgc...atacctaggagccctgtgatttggagagtgaaaactctttattaccg> ^ Pos.: -2981 ^ Pos.: -36

**Abb. 11 :** Sequenzen des Reportergen-Basisvektors ( pGL3, 'multiple cloning site' ), der Primer und der für die Konstrukt-Erstellung wichtigen Abschnitte der regulatorischen Sequenz der UGT1A6 ( UGT1A6 ). Die Erkennungssequenzen der für die Konstrukt-Erstellung verwendeten Restriktions-Endonukleasen sind durch die Zeichen '>', '<', '/', '\ ' und '-' hervorgehoben, nach dem Schnitt entstehende 5'-Überhänge mit '>', 3'-Überhänge mit '<', 'blunt end'-Schnitte mit '/' und weitere Basen mit '-'. Die bei der Sequenz des Vektors und des inklonierten regulatorischen Bereichs der UGT1A6 angegebenen Positionen beziehen sich auf das Startcodon des jeweiligen Strukturgens ( Firefly-Luciferase bzw. UGT1A6 ; mit Position -2981 des Cosmids endet die regulatorische Sequenz der UGT1A6 ). Unter den Sequenzen der Primer sind die theoretischen Hybridisierungs-Temperaturen in Verbindung mit den Matrizen-Einzelsträngen ( kürzere Abschnitte, ohne 5'-terminalen Bereich mit Fehlpaarungen zu Sequenz des Cosmids ) und in Verbindung mit amplifizierten Einzelsträngen ( abweichende Nukleotide sind bereits in den Gegenstrang eingeführt, gesamte Länge der Primer hybridisiert ).

Unter Verwendung der Restriktions-Endonukleasen HindIII als 3'-terminale und BglIII als 5'-terminale Verknüpfungs-Stelle konnten die gestellten Anforderungen vollständig erfüllt werden ( Abb. 10, 11 ) : 1.) Die - für die Herstellung von Deletions-Mutanten wichtigen - Schnitt-

stellen der "multiplen Klonierungsstelle" wurden 5'-terminal des eingefügten regulatorischen Bereichs positioniert. 2.) Unter Einführung weniger Punktmutationen konnte man die benötigten Erkennungssequenzen an solchen Stellen des Cosmids erzeugen, daß ein den nativen Verhältnissen entsprechender Abstand zwischen Promotor und Strukturgen resultierte. 3.) Nahezu der gesamte verfügbare 5-terminale Bereich ( bis auf ca. 40 bp ) des UGT1A6-Strukturgens wurde inkloniert.

Ausgehend von den eingeführten Erkennungssequenzen wurde ein Überhang von 8 bzw. 10 Nukleotiden gewählt, um so eine ausreichende Aktivität der Restriktions-Endonukleasen zu gewährleisten ( in unmittelbarer Nähe des Endes eines DNA-Doppelstrangs nimmt die Schnittleistung erheblich ab ).

### 2.6.2.2 Linearisierung des Cosmid-Vektors

Um als Matrize für die geplante präparative PCR dienen zu können, mußte der - die regulatorische Sequenz der UGT1A6 enthaltende - Cosmidvektor zunächst linearisiert werden.

Verwendet wurde dazu die Restriktions-Endonuklease HindII bei einem Verdaufaktor von 2. Nach erfolgter Linearisierung Hitze-inaktivierte man das Enzym 15 min bei 75°C. Der Ansatz wurde schließlich auf eine Endkonzentration von 100 ng/µl gebracht.

### 2.6.2.3 Präparative PCR

Bei einer präparativen PCR, die Ausgangsmaterial für Reporter-gen-Konstrukte liefern soll, muß auf einen geringen Anteil mutierter Amplifikate Wert gelegt werden. Eine grobe Abschätzung des nicht-mutierten Anteils in den Amplifikaten einer PCR gelingt mit :

$( 1 - \text{Amplifikat-Länge} / [ \text{bp} ] \times \text{Mutations-Wahrscheinlichkeit} / [ 1/\text{bp} ] )^{\text{Zyklusanzahl}}$

Dementsprechend war zum einen eine Minimierung der Zyklusanzahl anzustreben. Die mit einer Erniedrigung der Zykluszahl sinkende Ausbeute kann durch eine gleichzeitige Erhöhung der Konzentration an der als Matrize dienenden doppelsträngigen DNA ausgeglichen werden. Begrenzend wirkt jedoch eine bei hohen DNA-Konzentrationen einsetzende Hemmung der Polymerase-Ketten-Reaktion. Vorversuche wiesen eine DNA-Ausgangskonzentration von 2,0 ng/µl bei 10 PCR-Zyklen als geeignet aus ( Daten nicht gezeigt ).

Zum anderen sollte die Mutations-Wahrscheinlichkeit möglichst niedrig gehalten werden. In diesem Sinne wurde eine mit hoher Genauigkeit replizierende DNA-Polymerase ( Pfu-Polymerase, mit 'Proofreading'-Aktivität ) eingesetzt, die Konzentration des Kosubstrats dNTP auf einen niedrigen Wert eingestellt ( hohe Konzentrationen begünstigen die bimolekulare Polymerase-Reaktion gegenüber der monomolekularen "Korrektur-lesenden" 5'-3'-Exonuklease-Reaktion und somit die Wahrscheinlichkeit von Mutationen ), ein stöchiometrisches Verhältnis zwischen Primern und dNTPs gewählt, das die Primer als begrenzendes Kosubstrat wirken läßt ( s.u. ; sich bei einer Erschöpfung der dNTPs einstellende unterschiedliche Konzentrationen der einzelnen Spezies würden entsprechende Fehlpaarungen begünstigen ) sowie die PCR beim Übergang von der exponentiellen in die lineare Phase ( zufolge Vorversuchen bei ca. 2 % in das Amplifikat eingebauter dNTPs ; dieser Wert ist direkt meßbar als Verhältnis der Radioaktivität der Amplifikat-Bande zur Radioaktivität der gesamten Spur und somit von Versuch zu Versuch übertragbar ) gestoppt.

Mit einer Amplifikat-Länge von ca. 3000bp, einer Mutations-Wahrscheinlichkeit der eingesetzten Pfu-Polymerase von  $1,3 \times 10^{-6}$  /bp und einer Zyklusanzahl von 10 war mit einem Anteil an punktmutierten Amplifikaten von ca. 4% zu rechnen.

**Material :** 'Native Pfu DNA Polymerase' : Stratagene, La Jolla ( USA ) ;

### Arbeitsprotokoll

Arbeitsschritt	Komponente	Stammkonz.	Endkonz.	Vol. [ $\mu$ l ]
- in angegebener Reihenfolge mischen :	H <sub>2</sub> O <sub>ad inj</sub>			990
	Pfu-Buffer ( inkl. MgCl <sub>2</sub> )	10 $\times$ 20 mM	1 $\times$ 2,0 mM	120
	DNA-Matrize	100 ng/ $\mu$ l	2,0 ng/ $\mu$ l	24
	dNTP-Lösung	10 mM	0,25 mM	30
	Forward-Primer	20 $\mu$ M	100 nM	6
	Reverse-Primer	20 $\mu$ M	100 nM	6
	Pfu-Polymerase	2,5 u/ $\mu$ l	0,05 u/ $\mu$ l	24
- in 50 $\mu$ l-Aliquoten in PCR-Cups geben :	<b>PCR-Mix</b>			<b>1200</b>
<b>- Inkubieren :</b>	4°C - 2min 94°C - 10 $\times$ [ 1min 94°C - 30s 68°C - 6min 72°C - ] 10min 72°C - 4°C			

Die Primer-Konzentration entspricht 100 nM doppelsträngigen Amplifikats, die dNTP-Konzentration 167 nM. Für analytische Vorversuche wurde der PCR-Mix außerdem mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP entsprechend 2.4.4.2 versetzt.

### 2.6.2.4 Selektive Präzipitation

Um das erhaltene Amplifikat aufzukonzentrieren und von verbliebenen dNTPs zu trennen wurde eine - gegenüber der Standardprozedur modifizierte - selektive Präzipitation durchgeführt. Um eine ausreichende Ausbeute zu erhalten, mußten die PCR-Ansätze ( PCR-Puffer enthalten meist Detergenzien ) zusätzlich mit STE-Puffer versetzt werden und die Fällungsreaktion in kürzerer Zeit durchgeführt werden. Um eine ausreichende Abtrennung von Mononukleotiden zu erreichen, wurde anstatt Natriumacetat das Fällungsreagenz Ammoniumacetat eingesetzt ( allerdings auf Kosten der Ausbeute ; Daten nicht gezeigt ).

**Material :** Ethanol ; 70%-iges Ethanol

### Lösungen, Puffer

	Komponente	Konz.	Bemerkung
10 $\times$ STE-Puffer	NaCl	1,0 M	5,84g / 100ml bei 58,44 g/mol
	EDTA	100 mM	3,72g / 100ml bei 372,2 g/mol
	Tris	200 mM	2,42g / 100ml bei 121,1 g/mol
	HCl	pH 7,5	
Ammoniumacetat-Lsg.	NH <sub>4</sub> Acetat	10 M	77,1g / 100ml bei 77,08 g/mol

### Arbeitsprotokoll

400 $\mu$ l-Aliquote des PCR-Produkts in Eppendorf-Cups wurden mit jeweils 40  $\mu$ l 10 $\times$ STE-Puffer, 100  $\mu$ l 10M Ammoniumacetat-Lösung und 1000  $\mu$ l Ethanol versetzt. Die Ansätze zentrifugierte man dann sofort 30 min bei über 12000 $\times$ g und 4°C, nahm den Überstand vorsichtig ab, überschichtete mit 400  $\mu$ l eiskalten 70%-igen Ethanols, zentrifugierte nochmals 15 min bei über 12000 $\times$ g und 4°C, entfernte den Überstand, trocknete kurz und nahm das erhaltene Pellet in 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf. Die Lösung wurde mit anderen Lösungen des selben PCR-Ansatzes vereinigt und schließlich die DNA-Konzentration mittels Ethidiumbromid-Fluoreszenz bestimmt.

### 2.6.2.5 DNA-Rekombination

Die HindIII- und BglII-Erkennungssequenzen der "multiplen Klonierungsstelle" des Vektors und der Enden der einzuklonierenden regulatorischen Bereichs wurden nun geschnitten. Für die Endonuklease-Reaktion am einzuklonierenden DNA-Molekül wählte man dabei einen hohen Verdaufaktor von 20, um die verminderte Aktivität der Restriktions-Endonukleasen in der Nähe der Enden eines DNA-Moleküls zu kompensieren. Für den Vektor wurde ein Verdaufaktor von 8 angesetzt.

Der Vektor wurde anschließend dephosphoryliert ( vgl. 2.5.5 ; Verhinderung von Concatemeren, aufgrund unterschiedlicher Schnittstellen kann eine Religation nicht stattfinden ) und dann die Enzyme in den Lösungen des Vektors und des einzuklonierenden Abschnitts Hitzeinaktiviert ( 15 min bei 65°C ).

Vektor und einzuklonierende Sequenz wurden nun in einem stöchiometrischem Verhältnis von 1:1 gemischt und ligiert ( siehe 2.5.6 ).

### 2.6.2.6 Identifizierung

Mit den erhaltenen Konstrukten transformierte man wie in 2.5.3 beschrieben XL1-Blue-Bakterienzellen. Die nach der Anzucht und Vermehrung der Transformanten isolierten Plasmide wurden dann mit Hilfe geeigneter Restriktions-Endonukleasen ( vgl. Abb. 12 ) fragmentiert und in einer analytischen Gelelektrophorese getrennt ( vgl. 2.5.1, 2.5.2 und Abb. 13 ). Durch den Vergleich des erhaltenen Bandenmusters mit den zu erwartenden Fragmentlängen konnten die Plasmide identifiziert werden.

	TkLuc			pGL3	UGT1A6Luc								
	ARE5'	ARE4'			-225	-434	-765	-1449	-1550	-1806	-2330	-2981	
<b>Bbvl</b>	V	944, 550, 471, 419, 403, 387, 307, 267, 206, 86											
	I	1386 413 216	807 413 216	840 413 216	745	906	1116	1447	2102	2245	2069 346	2069 892	2069 665 516 360
<b>BanII</b>	V	3119											
	I	1506 598 374 315 172	1506 598 315 256 108	1506 598 315	1078 598 184	1078 598	1078 598 394	1078 598 446 279	1078 1264 446 268	1078 774 598 446 268	1078 774 598 446 268 256	1078 774 598 446 374 268 256	1078 988 774 598 446 268 256
<b>NciI</b>	V	1419, 696, 555, 490, 351, 58											
	I	1704 290 247 129 89 76	1522 290 247 129 89 76	1158 290 247 129 89 76	1158 90	1410	1620	1951	2606	1590 1158	2970	3516	3006 1158
<b>Scal</b>	V	3380, 1083											
	I	1643	1461	1097	355	516	726	1057	1712	1855	2076	2622	3271

**Abb. 12** : Zur Identifizierung der verschiedenen erstellten Konstrukte geeignete Restriktions-Endonukleasen und die zu erwartenden Fragmentlängen. Unter 'V' sind die gemeinsamen, aus dem "Vektor-Rückrat" entstehenden Fragmente, unter 'I' die von Konstrukt zu Konstrukt unterschiedlichen, aus dem inklonierten "Insert" entstehenden Fragmente aufgeführt. Fragmente kleiner als 30bp wurden vernachlässigt.

'Bbvl' erlaubt insbesondere eine zuverlässige Identifikation des "Vektor-Rückrats", 'BanII' die der inklonierten Sequenzen beim UGT1A6Luc-2981-Konstrukt und den verschiedenen Deletionsmutanten

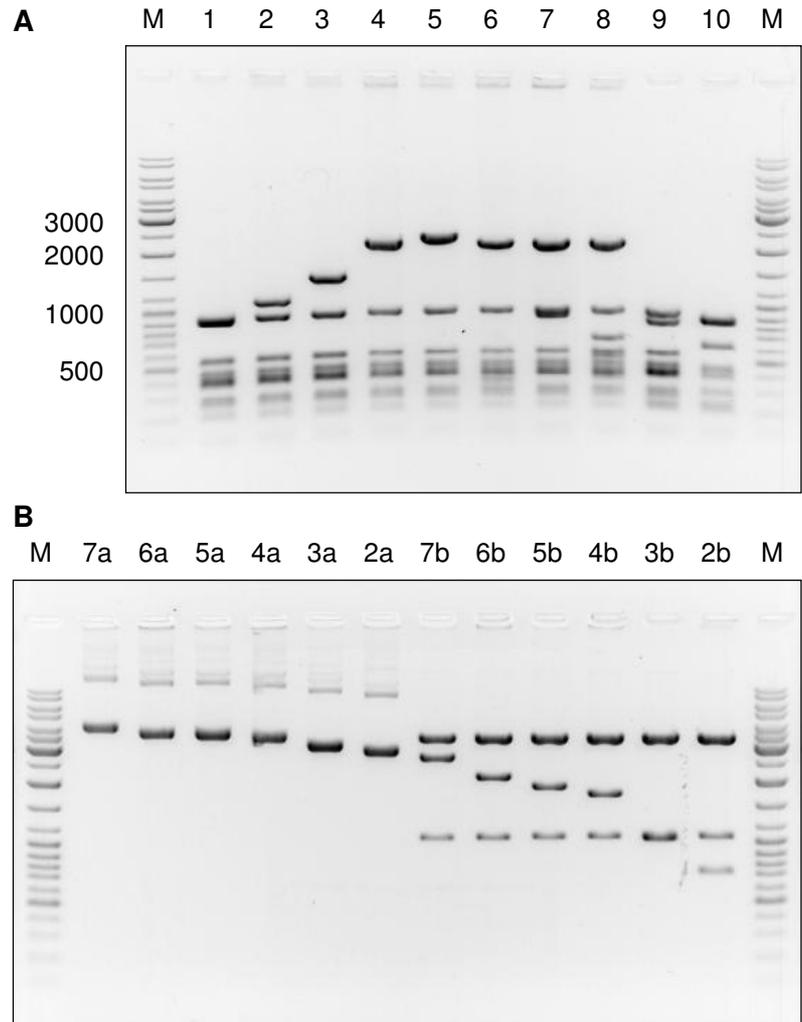
und 'NciI' die der einklonierten Sequenzen bei den TkLuc-Konstrukten. *Scal* war insbesondere geeignet, um die vor der Quantifizierung der Deletions-Mutanten mit Hilfe der Ethidiumbromid-Fluoreszenz notwendige Linearisierung durchzuführen.

**Abb. 13:** Analytische Gelelektrophoresen zur Identifizierung und Quantifizierung von Konstrukten. **A)** Identifizierung verschiedener Konstrukte anhand der Fragmentierung durch die Restriktions-Endonuklease 'BbvI'.

**B)** Überprüfung und Quantifizierung verschiedener Konstrukte nach Linearisierung. **a** : nicht fragmentierte, zirkuläre, superspiralisierte Konstrukte - über den Hauptbanden die immer zu einem gewissen Anteil vorhandenen Concatemere der jeweiligen Konstrukte ; **b** : mit Hilfe der Restriktions-Endonuklease 'Scal' linearisierte Konstrukte - die Banden des "Vektor-Rückrats" ( bei 3380 und 1083 bp, vgl. Abb. 12 ) erlauben den direkten Vergleich stöchiometrischer Verhältnisse anhand der Ethidiumbromid-Fluoreszenz.

Folgende Konstrukte wurden analysiert : 1-8 : UGT1A6Luc -225, -434, -765, -1449, -1550, -1806, -2330, -2981 ; 9 : TkLuc ; 10 : pRL-TK. Im Marker ( M ) vorhandene Fragmentlängen :

100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp.



### 2.6.3 Deletionsmutanten

Die Deletionsmutanten konnten nun erstellt werden, indem man mit Hilfe von Restriktions-Endonukleasen 5'-terminale Abschnitte der regulatorischen Sequenz der UGT1A6 ausschneidet, ggf. erhaltene DNA-Enden modifiziert, das verbliebene lineare Konstrukt mittels präparativer Gelelektrophorese isoliert und dann religiert ( vgl. Abb. 25A ).

**Material :** Restriktions-Endonukleasen *Sma*I, *Sac*I, *Apa*I, *Asp*718, *Stu*I, *Mlu*NI, *Pvu*II : Roche Molecular Biochemicals, Mannheim ; Restriktions-Endonuklease *Bpu*10I : MBI Fermentas, St. Leon-Rot ; 'suRe/Cut Buffer' Puffersystem für Restriktions-Endonukleasen : Roche Molecular Biochemicals, Mannheim ;

## Arbeitsprotokoll

Es wurden im allgemeinen - unter Verwendung des 'suRe/Cut Buffer'-Systems - jeweils 5 µg DNA in einem Volumen von 15 µl bearbeitet. Zur Erstellung der Deletionsmutante UGT1A6Luc-225 nahm man die zweite Endonuklease-Reaktion in 30 µl vor, im Anschluß mußte außerdem eine 'blunt end'-Generierung ( vgl. 2.5.4 ) durchgeführt werden.

Deletionsmutante	-2330	-1806	-1550	-1449	-765	-434	-225
1. Enzym, Verdaufaktor	Smal, 4	Sacl, 4	Apal, 4	Asp718, 4	Smal, 4	Smal, 4	Smal, 4
suRe/Cut Buffer, Temp.	A, 25°C	A, 37°C	A, 30°C	B, 37°C	A, 25°C	A, 25°C	A, 25°C
2. Enzym, Verdaufaktor	Stul, 4				MluNI, 4	PvuII, 16	Bpu10I, 4
suRe/Cut Buffer, Temp.	A, 37°C				A, 37°C	A, 37°C	2×A+, 37°C

Beim Puffer A+ handelt es sich um den 'suRe/Cut Buffer' A, dem zusätzlich Rinder-Serum-Albumin ( BSA, siehe 2.5.4 ) zu einer Endkonzentration von 100 ng/µl zugegeben wurde. In 2×A+ sind die Komponenten in jeweils doppelter Endkonzentration enthalten.

Präparative Gelelektrophorese, "Rezirkularisierung" ( Religation ) der linearen Konstrukte, Transformation, Anzucht und Vermehrung der Transformanten sowie Plasmid-Isolierung und Identifizierung erfolgte wie beschrieben ( vgl. 2.5, 2.6.2.6 ).

### 2.6.4 TkLuc-Konstrukt

Das TkLuc-Konstrukt entstand durch die Einklonierung der im pTKRL-Vektor enthaltenen regulatorischen Sequenz des Thymidinkinase-Promotors des Herpes Simplex Virus in den pGL3-Reportergen-Vektor, und zwar 5'-terminal des Firefly-Luciferase-Strukturgens ( vgl. Abb. 26C ). Auch hier konnte mit Hilfe der Restriktions-Endonukleasen HindIII und BglII eine "gerichtete" Ligation durchgeführt werden. Beide Ausgangsvektoren wurden mit einem Verdaufaktor von 8 geschnitten und die interessierenden Abschnitte ( einzuklonierender Abschnitt 759 bp, Vektor 4801 bp ) mit Hilfe einer präparativen Gelelektrophorese ( 2.5.1.3 ) isoliert. Man dephosphorylierte den linearisierten Vektor ( 2.5.5 ) und ligierte in einem stöchiometrischen Verhältnis von 2:1 ( einzuklonierender Abschnitt zu linearisiertem Vektor ; 2.5.6 ).

Transformation, Anzucht und Vermehrung der Transformanten sowie Plasmid-Isolierung und Identifizierung erfolgte wie beschrieben ( vgl. 2.5, 2.6.2.6 ).

### 2.6.5 UGT1A6-TkLuc-Konstrukte

Ausgehend von den Deletions-Mutanten und dem TkLuc-Vektor konnten schließlich Konstrukte erstellt werden, in denen auf regulatorische Sequenzen der UGT1A6 zunächst der "artifizielle Promotor" 'TK' und schließlich das Firefly-Luciferase-Strukturgen folgten ( in 5'-3'-Richtung ; vgl. Abb. 26C ). Neben den in der regulatorischen Sequenz vorhandenen Endonuklease-Schnittstellen wurden dabei die in den "multiplen Klonierungsstellen" verwendet, die 5'-terminal des regulatorischen Bereichs in den Deletionsmutanten und 5'-terminal des artifiziellen Promotors im TkLuc-Konstrukt verblieben waren.

Auf diese Weise konnte man in Verbindung mit der Endonuklease Sacl und der Deletionsmutante UGT1A6Luc-2330 den regulatorischen Bereich der UGT1A6 zwischen Position -2330 und -1806 ( in einem Fragment von 546 bp Länge ) ausschneiden und vor den artifiziellen Promotor einklonieren ( TkLuc-Vektor mit Sacl aufgeschnitten, 5560 bp ). In Verbindung mit der Endonuklease Asp718 und der Deletionsmutante UGT1A6Luc-1806 wurde der Bereich

zwischen Position -1806 und -1449 ( in einem Fragment von 364 bp Länge ) ausgeschnitten und in den TkLuc-Vektor ( mit Asp718 aufgeschnitten ) inkloniert.

Die Endonuklease-Reaktionen wurden wieder mit einem Verdaufaktor von 8 durchgeführt, die Fragmente isoliert, der Vektor dephosphoryliert und in einem stöchiometrischen Verhältnis von 2:1 ligiert ( vgl. 2.5 ).

Transformation, Anzucht und Vermehrung der Transformanten sowie Plasmid-Isolierung erfolgte wie beschrieben ( vgl. 2.5.3 ).

### Identifizierung

Da bei der beschriebenen "Klonierungs-Strategie" der Einsatz einer direktionalen Ligation nicht möglich war, konnten die sich ergebenden Konstrukte die inklonierten Sequenzen sowohl in der gewünschten ( 'sense' ) als auch in entgegengesetzter Richtung ( 'antisense' ) enthalten. Anhand einer analytischen Fragmentierung der Konstrukte mit Hilfe geeigneter Restriktions-Endonukleasen konnte man diese unterscheiden. Zusätzlich wurden die in Abb. 12 beschriebenen "Restriktions-Analysen" durchgeführt.

Konstrukt	ARE4'-TkLuc		ARE5'-TkLuc	
	SacI	XbaI	BfrI	XbaI
Fragm. - sense	5560, 364	3125, 2799	5839, 134, 124	3566, 2540
Fragm. - antisense	5912	3393, 2531	5451, 531, 124	3146, 2960

## 2.7 Transfektion

### 2.7.1 Einleitung

Für das "Einbringen" von DNA-Molekülen in eukaryotische Zellen, die sogenannte 'Transfektion', existieren unterschiedliche Methoden. Bei der chemischen Transfektion wird einerseits die negative Ladung der DNA durch positiv geladene Gruppen oder Moleküle neutralisiert, des weiteren wird versucht, über Prinzipien wie Kopräzipitation oder Einbindung der positiv geladenen Gruppen in makromolekulare Strukturen den gebildeten Komplexen eine kompakte Gestalt zu geben. Diese Komplexe werden dann durch Vorgänge wie z.B. Phagozytose oder Pinocytose in die Zellen - im Umfeld eines intakten Zellrasens - inkorporiert.

Bei der Elektroporation werden die - vereinzelt - Zellen dahingegen in Anwesenheit der zu transfizierenden DNA-Moleküle kurzzeitig einem elektrischen Feld ausgesetzt, was zu einer erhöhten "Durchlässigkeit" der Plasmamembran für die DNA führt. Es wird davon ausgegangen, daß dafür im Moment des elektrischen Pulses entstehende Poren in der Zellmembran verantwortlich sind.

Die chemischen Transfektionsmethoden sind weniger arbeitsaufwendig, liefern jedoch bei relativ großen ( > 5000 bp ) DNA-Molekülen oft schlechte Transfektionsausbeuten. Vorversuche mit verschiedenen Transfektions-Reagenzien zeigten, daß dies auch in Verbindung mit dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellkultur-Modellsystem Caco-2/TC7 und den zu transfizierenden Konstrukten ( 5000-7700 bp Länge ) der Fall ist ( Daten nicht gezeigt ). Überhaupt maßgebliche Transfektionsausbeuten waren außerdem nur in einem sehr schmalen Zeitrahmen bezüglich des Konfluenz-Zustands der Zellkultur erreichbar ( ca. 1 Tag präkonfluent ± 6 Stunden ). Zusammen mit dem Umstand, daß nach Verstreichen einer obligatorischen Erholungsphase der Zellkultur der optimale Zeitpunkt zum Beginn einer Behandlung mit Induktoren der antioxidativen Antwort bereits 24 Stunden überschritten gewesen

wäre, ließ dies die untersuchten chemischen Transfektionsmethoden als nicht geeignet erscheinen.

Schon hinsichtlich der grundsätzlichen Methode weist damit die Elektroporation Vorteile auf - bei ihr werden die Zellen in bereits transfiziertem Zustand ausplattiert, die Wahl eines Behandlungs-Zeitraums steht damit frei. Zusätzlich waren die erreichten Transfektionsausbeuten höher und einfacher zu reproduzieren.

## 2.7.2 DNA-Lösungen

Bei der Elektroporation nimmt die Transfektionsausbeute mit der DNA-Konzentration bis zu einem Wert von 50 µg/ml ( im Elektroporations-Medium ) deutlich zu ( van den Hoff M.J., 1995 ). Eine weitere Erhöhung wirkt sich dahingegen immer weniger vorteilhaft aus. Aus diesen Gründen wurde - entsprechend dem sich ergebenden Verdünnungsfaktor von 1:20 ( vgl. 2.7.3 ) - eine Konzentration von etwa 1 mg/ml in den für die Elektroporation einzusetzenden DNA-Lösungen angestrebt.

Gleichzeitig sollte - um bimolekulare Wechselwirkungen zwischen experimenteller regulatorischer Sequenz und dem Promotor des Bezugskonstrukts zu vermeiden ( Farr A., Roman A., 1992 ) - zumindest einer der beiden Reporter-Gen-Vektoren in relativ geringer Konzentration eingesetzt werden. Da mit verhältnismäßig gleichbleibenden Aktivitäten des Bezugs-Reporters zu rechnen war ( vgl. 2.8.1 ), wurden hier Signal-Intensitäten angestrebt, die sich im Bereich des 10- bis 20-fachen ( 25.000 - 50.000 Luminiszenz-Ereignisse pro 10 s ) der Blindwerte ( Autoluminiszenz des Coelenterazins, ca. 2.500 Luminiszenz-Ereignisse pro 10 s ) bewegten.

Im Rahmen dieser Arbeit ergaben sich diese Renilla-Luminiszenzen beim Einsatz von 5 µg/ml pRL-TK ( in der DNA-Lösung, entsprechend einer Konzentration von 250 ng/ml im Elektroporations-Medium ). Der Firefly-Reporter unter der transkriptionellen Kontrolle der regulatorischen Sequenzen der UGT1A6 führte bei den oben gewählten DNA-Konzentrationen zu 5- bis 20-fach höheren Luminiszenz-Werten.

Voraussetzung für den Vergleich unterschiedlicher experimenteller Konstrukte in einer Reporter-Gen-Analyse ist außerdem die Einstellung eines identischen Stoffmengen-Verhältnisses zwischen experimentellem und Bezugs-Reporter-Gen-Konstrukt in allen zu transfizierenden DNA-Lösungen ( vgl. 2.8.1 ). Da insbesondere die Deletions-Analyse dabei eine hohe Genauigkeit erfordert, wurden die über photometrische Messungen ermittelten Konzentrationen der beteiligten Plasmide zusätzlich mittels Ethidiumbromid-Fluoreszenz verifiziert ( vgl. Abb. 13 ).

Um den unterschiedlichen Längen der experimentellen Konstrukte Rechnung zu tragen, wurde im weiteren wie folgt vorgegangen.

Die Konzentration eines experimentellen Konstrukts von 5000bp Länge wurde auf 1,0 mg/ml in der DNA-Lösung gesetzt. Der einzustellende DNA-Gehalt bei experimentellen Konstrukten ( 'c(exp. Konstr.) ) abweichender Länge betrug damit :

$$c(\text{exp. Konstr.}) = [ \text{Länge des experimentellen Konstrukts} \div 5000\text{bp} ] \times 1,0 \text{ mg/ml.}$$

Die Konzentration des in allen Ansätzen einheitlich verwendeten Bezugs-Konstrukts TkLuc wurde auf 5,0 ng/µl gesetzt.

Für die Deletionsanalyse wurden die benötigten DNA-Lösungen dementsprechend folgendermaßen erstellt ( mit einer Stammkonzentration des experimentellen Konstrukts von 2,0 mg/ml und des Bezugs-Konstrukts von 25 µg/ml :

Deletions-Mutante	UGT1A6Luc							
	-225	-434	-765	-1449	-1550	-1806	-2330	-2981
Länge [ bp ]	4979	5189	5520	6175	6318	6539	7085	7734
c( exp.Konstr. ) [ mg/ml ]	0,996	1,038	1,104	1,235	1,264	1,308	1,417	1,547
Vol.( exp.Konstr. ) [ µl ]	65,7	68,5	72,9	81,5	83,4	86,3	93,5	102,1
Vol.( H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ) [ µl ]	39,9	37,1	32,7	24,1	22,2	19,3	12,1	3,5
Vol.( Bez.-Konstr. ) [ µl ]	26,40							
Vol.( Σ ) [ µl ]	132,0							

### 2.7.3 Elektroporation

Die hier aufgeführte Prozedur bezieht Ergebnisse bezüglich günstiger Elektroporations-Medien und DNA-Konzentrationen ( van den Hoff M.J. et al., 1995 ) sowie der Auswirkung verschiedener Temperatur-Protokolle ( Rols M.P. et al., 1994 ) mit ein. Sie wurde außerdem hinsichtlich der eingesetzten Feldstärke und Pulsdauer sowie der Reproduzierbarkeit der Transfektionseffizienz und Überlebensrate optimiert ( Daten nicht gezeigt ).

Als Elektroporationsmedium setzte man dabei einen den intrazellulären Verhältnissen eukaryotischer Zellen nahekommenden Puffer ein. Insbesondere die Zerstörung von Zellorganellen aufgrund hoher Natrium-Konzentrationen und die Aktivierung verschiedenster Signalkaskaden durch unphysiologisch hohe Konzentrationen des sekundären Signalvermittlers ( 'second messenger' ) Calcium konnten so vermieden werden. Die Zellen wurden des Weiteren vor der Elektroporation auf 4°C abgekühlt und danach in voräquilibriertem Kulturmedium suspendiert. Bei gleicher Feldstärke und Pulsdauer konnten dadurch höhere Transfektions-Ausbeuten erreicht und die schädliche Wirkung bei der Elektroporation im Medium entstandener toxischer Substanzen eingeschränkt werden.

**Geräte, Verbrauchsmaterial** : Elektroporations-Gerät 'Easyject Optima', Küvetten 4mm: 'ECU 104' : EquiBio Ltd., Kent ( UK ) ; 12well-Zellkulturplatten 'Falcon 353225' : Becton Dickinson, Heidelberg .

#### Lösungen, Puffer

Bezeichnung	Komponente	Konzentration	Bemerkung
20×KCl-Lsg.	KCl	2,4 M	8,95g / 50ml bei 74,56 g/mol
20×CaCl <sub>2</sub> -Lösung	CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O	3,0 mM	22,1mg / 50ml bei 147,0 g/mol
20×Phosphat-P.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> KOH	200 mM pH 7,6	1,361g / 50ml bei 136,1 g/mol ( fest )
20×HEPES-P.	HEPES KOH	0,5 M pH 7,6	5,96g/ 50ml bei 238,3 g/mol ( fest )
20×EGTA-Lsg.	EGTA KOH	40 mM pH 7,6	761mg / 50ml bei 380,4 g/mol ( 10M )
20×MgCl <sub>2</sub> -Lsg.	MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	100 mM	1,017g / 50ml bei 203,3 g/mol
2,5×ATP-Lsg.	ATP KOH	5,0 mM pH 7,6	110mg / 40ml bei 551,2 g/mol ( 1M ) aliquot. in 5ml-Port., lagern bei -20°C

HEPES = 2[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny]-ethansulfonsäure : Serva, Heidelberg ; EGTA = Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure ( für die Molekularbiologie ) ; ATP ( für die Molekularbiologie ) : Roche Molecular Biochemicals, Mannheim .

## Arbeitsprotokoll

Die für die Elektroporation erforderlichen Zellen wurden von einem Tag postkonfluenten Zellkulturen in 10cm-Zellkulturschalen erhalten. Bei der Caco-2/TC-7-Zellkultur konnten aus einer solchen Platte ca.  $8 \times 10^6$  trypsinierte Zellen gewonnen werden. Abhängig von der Anzahl an Transfektions-Gruppen ( T ), für die jeweils  $4 \times 10^6$  Zellen benötigt wurden, mußte die entsprechende Anzahl an Zellkulturen ( Z ) vorbereitet und verarbeitet werden (  $Z \geq T \div 2$  ).

Arbeitsschritt	Komponente	Vol./Mng.	Bemerkung
- Vorbereiten	Kulturmedium	60 ml	äquilibriert in 250ml-Erlenmeyerkolben ; "Sammelmedium" für Zellsuspension
	Kulturmedium	40ml - ( Z × 2,5ml)	äquilibriert in 100ml-Erlenmeyerkolben ; für Trypsininaktivierung
	Kulturmedium	T × , je 12 ml	äquilibriert, jeweils in 100ml-Erlenmeyerkolben ; für Aufnahme transfizierter Zellen
	2,5×Trypsin-Lsg., 0,9mm-Kanüle, 10ml-Spritze	T ×	Trypsin noch nicht auftauen, nach Zeitschema vorgehen ( s.u. )
	100ml-Becherglas, 100ml-Erlenmeyerkolben, zwei 50ml- und ein 15ml-Zentrifugenröhrchen, jeweils steril ; zwei 0,22µm-Sterilfilter-Spritzenaufsätze, eine 10ml und eine 50ml-Spritze ; 2 Fuchs-Rosenthal-Zählkammern, "T ×" 4mm-Elektroporationsküvetten		
- 2×CytoMix-Lsg. herstellen	24ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> + 6ml KCl-Lsg. + 6ml CaCl <sub>2</sub> -Lsg. + 6ml Phosphat-Puffer + 6ml HEPES-Puffer + 6ml EGTA-Lsg. + 6ml MgCl <sub>2</sub> -Lsg.		
	2×CytoMix-Lsg.	60 ml	in 100ml Becherglas
- Aliquot abnehmen		6 ml	in 15ml-Zentrifugenröhrchen
- Waschlösung herstellen	2×CytoMix-Lsg.	54 ml	verbliebener Rest im Becherglas ( s.o. )
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	54 ml	
	Waschlösung	108 ml	
- sterilfiltrieren	0,22µm-Membr. 50ml-Spritze	durch Membran ( vorher wässern ) in 100ml-Erlenmeyerkolben sterilfiltrieren	
- Zellen vereinzeln	nach folgendem Zeitschema die einzelnen Arbeitsschritte durchführen. Sollten mehr als 3 ( im Schema A bis C ) Zellkulturen zu verarbeiten sein, Zellsuspension steril verschließen, zwischenzeitlich im Brutschrank lagern und in einem zweiten Durchgang weitere Zellkulturen ( D ... ) vereinzeln.		
- 1.	2,5×Trypsin-Lsg. aus -20°C-Kühltruhe entnehmen ( vgl. 2.2.1.4 ) ; 10min in 37°C-Wasserbad auftauen und vorwärmen.		
- 2.	Trypsin-Lsg. auftragen ( direkt aus Röhrchen auf den Zellrasen gießen ) ; Zellkulturen im Brutschrank inkubieren.		
- 3.	Zellrasen durch kräftige seitliche Stöße vom Kulturboden lösen ; nach 7-7,5min Einwirkung Verdau-Vorgang durch Zugabe von 2ml vorgewärmtem Medium ( für Trypsininaktivierung ) stoppen ; Zellen vereinzeln, indem die Suspension mehrmals durch die Kanüle passiert wird ( 5 Mal aufsaugen und wieder ausstoßen, vgl. 2.2.1.4 ) ; Suspension dann in das "Sammelmedium" überführen.		
<pre> 0  1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 . ~A1~  ~B1~  ~C1~  ~A2~  ~B2~  ~C2~  ~A3~  ~B3~  ~C3~  ~D1~ Kulturmedien für Trypsininaktiv. und Zellsupsp. aus Brutschrank nehmen  ~~~  wieder in Brutschrank  ~~~ </pre>			

- Zellen zählen	restliches Medium für Trypsininaktivierung zu Zellsuspension geben ( ergibt 100ml ), 4 Mal jeweils durch kräftiges Schwenken Zellen gründlich suspendieren, sofort ein Aliquot ( steril, mit Pasteurpipette ) entnehmen und in Fuchs-Rosenthal-Kammern pipettieren ( 2 Kammern mit 4 Zählleinheiten ) ; Zellen zählen ( Zellsuspension zwischenzeitlich im Brutschrank lagern ) - pro Zählleinheit mindestens 4 Kleinquadrate oder 250 Zellen ( 1 Zelle pro Kleinquadrat entspricht Zellmenge für 2 Transfektionsgruppen ) ; in der Zellsuspension enthaltene Zellmenge berechnen ( mit 100ml Zellsuspensions-Volumen : durchschnittliche Zellzahl pro Kleinquadrat $\times 0,5 \times 10^6$ ; vgl. 2.2.1.4 )		
- Elektroporations Medium herstellen	2×CytoMix-Lsg.	5,0 ml	
	2,5×ATP-Lsg.	4,0 ml	
	GSH	50 $\mu$ mol	fest ; 15,4 mg bei 307,3 g/mol
	1,1×Elektroporations-Medium	9,0 ml	( ergibt mit DNA-Lsg. und Zell-Pellet 10ml Zellsuspension in 1,0×CytoMix )
- sterilfiltrieren	0,22 $\mu$ m-Membr., 10ml-Spritze	durch Membran ( vorher wässern ; um Verdünnung zu vermeiden, die ersten 1,5 ml des durch die Membran filtrierten Mediums verwerfen ) in steriles 50 ml-Zentrifugenröhrchen sterilfiltrieren	
- Zellen waschen	Zellen ( maximal $75 \times 10^6$ ; ggf. nur Teilvolumen der Suspension weiterverarbeiten ) in 50ml-Zentrifugenröhrchen durch 6-minütige Zentrifugations-Schritte bei $300 \times g$ ( 1400rpm bei $r_{max}=14cm$ ) und $4^\circ C$ pelletieren ( klaren Überstand jeweils mit an Absaugvorrichtung angeschlossener Pasteurpipette vorsichtig abnehmen ) ; 2 Mal in 54 ml Waschlösung resuspendieren, erneut wie oben pelletieren ;		
- Zellsuspension für Elektroporation herstellen	Zellpellet		
	1,1×Elektroporations-Medium	90 $\mu$ l / $1 \times 10^6$ Zellen ( sollte bei Erhalt des Zellpellets bereits vorbereitet sein und sofort zugegeben werden )	
	Zellsuspension	zwischenzeitlich auf Eis lagern	
- Elektroporation	Mit einem gleichbleibenden Zeitversatz ( nach Möglichkeit 1 min ) zunächst den Arbeitsschritt 1 für alle Transfektionsgruppen durchführen, dann die vorbereiteten Kulturmedien für die einzelnen Gruppen aus dem Brutschrank nehmen, öffnen und mit dem selben Zeitversatz Arbeitsschritt 2 durchführen. Ideal ist eine Präinkubations-Phase ( Abstand von 1. zu 2. ) von 10 min und ein möglichst schnelles Durchführen des Arbeitsschrittes 2 ( das Elektroporations-Medium ist nach Einwirkung des Pulses toxisch ).		
- 1.	20 $\mu$ l DNA-Lösung ( 1,0 $\mu$ g/ $\mu$ l ) und 380 $\mu$ l ( der immer wieder aufzuschlämmenden ) Zellsuspension in eine 4mm-Elektroporations-Küvette geben, verschließen und auf Eis stellen		
- 2.	durch Schütteln der Küvette die Suspension nochmals aufschlämmen, in das Elektroporations-Gerät geben, Puls auslösen ( 280V, 1500 $\mu$ F, $\infty \Omega$ ; <sup>1)</sup> ) ; sterile Pasteurpipette vorbereiten, elektroporierte Zellen ( mit Hilfe der vorbereiteten Pipette ) aus der Küvette in eines der Kulturmedien überführen und durch Schwenken im Medium verteilen		
- Ausplattieren, Kultivieren	Die Suspensionen der transfizierten Zellen jeweils auf die 12 Mulden einer 12well-Zellkulturplatte verteilen ( bei Zell-schonender Arbeitsweise wird Präkonfluenz nach 40 - 50 h erreicht <sup>2)</sup> ) ; 20 min im Brutschrank Temperatur-äquilibrieren, abgesetzte Zellen durch Schwenken nochmals aufschlämmen, wieder in Brutschrank geben ; nach 24 h Medienwechsel durchführen, dabei äußerst behutsam vorgehen ( Zellen sind nach 24 h noch nicht sehr fest angewachsen ).		

GSH = Glutathion ( 'cell culture tested' ) : Sigma-Aldrich, St.Louis ( USA ) .

- 1) dabei beträgt die Überlebensrate ca. 20% und es ergibt sich eine Zelldichte von :  
 $0,20 \times 4,0 \times 10^6 \text{ Zellen} \div (12 \text{ Mulden} \times 3,8 \text{ cm}^2/\text{Mulde}) = 18.000 \text{ Zellen/cm}^2$
- 2) bei 280V mit einer Spaltbreite von 4,0 mm ergibt sich eine Feldstärke von 700 V/cm ; bei 1500  $\mu\text{F}$  ohne parallel geschalteten Widerstand ( $\infty\Omega$ ) und einer Befüllung mit 400  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit einer Zelldichte von  $10 \times 10^6$  Zellen/ml in 1 $\times$ CytoMix eine Puls-Halbwertszeit von 38-40 ms.

## 2.8 Reporteragen-Analyse

### 2.8.1 Einleitung

Zur Messung transkriptioneller Regulations-Mechanismen eingesetzte Reporteragen-Systeme verwenden im allgemeinen zwei Reporteragen-Konstrukte, die in einem gewissen molaren Verhältnis in das zu untersuchende Zellsystem transfiziert werden. Als Bezug dient der Vektor, der eine konstitutive Expression seines Reporteragens vermittelt. Die zu untersuchende (regulierende) Gen-Sequenz befindet sich dahingegen auf dem zweiten Konstrukt und kontrolliert dort die Expression eines anderen, "experimentellen" Reporteragens. Durch eine Bezugnahme des Signals dieses experimentellen Reporteragens auf die Signale des konstitutiv exprimierten Reporteragens als "internem Standard" werden dann z.B. Unterschiede in der Transfektionseffizienz oder Volumenfehler bei der Probennahme eliminiert, da sich Abweichungen auf beide Signale in der gleichen Art und Weise auswirken.

Beim verwendeten 'Dual-Luciferase-Assay' wird als Bezugs-Reporteragen die Renilla-Luciferase und als experimentelles Reporteragen die Firefly-Luciferase eingesetzt. Diese beiden Enzyme entwickelten sich in der Evolution unabhängig voneinander und katalysieren dementsprechend so unterschiedliche Reaktionen, daß sich nach der Messung der Firefly-Luminiszenz (unter Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin) und Zugabe eines zweiten Reagenz selektiv (durch Umpuffern und 'Quenchen' der Firefly-Luminiszenz) die Renilla-Luminiszenz (unter Umsetzung von Coelenterazin zu Coelenteramid) gemessen werden kann. Die exprimierten Mengen der beiden Enzyme können so über einfache Luminiszenz-Messungen in ein und demselben Ansatz quantifiziert werden, was eine weitere Ursache Zufalls-bedingter Fehler beseitigt.

### 2.8.2 Behandlung der Zellkulturen

Die transfizierten und bis zur 24-stündigen Präkonfluenz herangewachsenen Zellkulturen behandelte man im allgemeinen 42 h mit 400 $\mu\text{l}$  Medium pro  $\text{cm}^2$  Zellkulturfläche (1,5ml pro Mulde bei 12well-Zellkulturplatten mit 3,8  $\text{cm}^2$  pro Mulde). Es wurde nach 21 h ein Medienwechsel durchgeführt. Die DMSO-Konzentration im Medium belief sich dabei auf 0,02%.

### 2.8.3 Herstellung der Zellhomogenate

Entgegen den Hersteller-Angaben war für eine reproduzierbare Aktivität des experimentellen Reporteragens in Verbindung mit der Caco-2/TC7-Zellkultur bei der Herstellung der Zellhomogenate ein Arbeiten auf Eis notwendig. Längere Inkubationszeit bei Raumtemperatur mit den empfohlenen Lysis-Reagenzien führte zu einem drastischen Abfall der Firefly-Luciferase-Aktivität. Zudem waren die Meßergebnisse abhängig von der Länge der Lyse (zunächst zunehmende, dann wieder abnehmende Firefly-Aktivitäten). Es mußte deshalb versucht

werden, durch ein Zeitschema die Inkubationsdauer verschiedener Behandlungsgruppen einheitlich zu gestalten.

**Material :** 'Passive Lysis Buffer' ( enthalten im 'Dual-Luciferase Reporter Assay System' ), Promega, Madison ( USA ) .

#### **Arbeitsprotokoll**

- 1. Zellernte :** Die Zellen wurden nach Abschluß der Behandlung drei Mal mit PBS-Puffer gewaschen, beim letzten Waschschrift der Puffer gründlich abgesaugt, 40 µl 'Passive Lysis Buffer' pro cm<sup>2</sup> Kulturfläche ( 150 µl bei 12well-Kulturplatten ) auf die einzelnen Zellkulturen gegeben, sofort ( Zellkulturplatten-weise ) bei -70°C eingefroren und bei dieser Temperatur bis zur weiteren Verwendung gelagert.
- 2. Lyse und Homogenisierung :** Man entnahm jeweils eine der Zellkulturplatten dem Kühlgerät, legte sie auf einer Tischplatte ab und beließ sie dort bis zum vollständigen Auftauen der Flüssigkeit. Durch Trituieren wurde am Kulturboden verbliebenes Zellmaterial gelöst, die sich ergebende Suspension homogenisiert und diese abschließend in Eppendorfcups überführt. Um die Zellkulturen einen definierten Zeitraum zu lysieren, ging man dabei Zellkulturplatten-weise vor, beließ die Eppendorf-Cups bei Raumtemperatur ( um bereits überführte und noch nicht verarbeitete Zellkulturen bei der gleichen Temperatur zu halten ) und frof 20 min nach dem Auftauen der Zellkulturen einer Platte die erhaltenen Lösungen wieder ein.

### **2.8.4 Messung der Reportergergen-Aktivitäten**

**Geräte, Verbrauchsmaterial :** Luminometer 'LB 9507' : Berthold EG&G, Bad Wildbad ; Meßröhrchen 55.476 : Sarstedt AG, Nümbrecht .

**Material :** 'Dual-Luciferase Reporter Assay System', Promega, Madison ( USA ) .

#### **Arbeitsprotokoll**

Das 'Luciferase Assay Reagent II' und das 'Stop & Glow Reagent' stellte man entsprechend der Hersteller-Angaben her.

Das eingefrorene Zellmaterial wurde auf Eis aufgetaut, dann trituiert und 10 µl in ein Meßröhrchen überführt. Nun pipettierte man, in scharfem Strahl, 100 µl des auf 25°C temperierten 'Luciferase Assay Reagent II' zu, gab das Röhrchen sofort in das Meßgerät und maß nach 2 s Verweildauer für 10 s die Luminiszenz der Firefly-Luciferase. Dann wurde, ebenfalls in scharfem Strahl, 100 µl des vortemperierten 'Stop & Glow Reagent' zupipettiert und wieder wie oben eine Messung der Luminiszenz der Renilla Luciferase durchgeführt.

## 2.9 GelShift-Analyse

### 2.9.1 Herstellung der Oligonukleotid-Sonden

#### 2.9.1.1 Vorbereitung der Oligonukleotide

Die Oligonukleotide ( vgl. 3.3.1, Abb. 22 ) wurden von der 'MWG-Biotech AG' ( 'http://www.mwgdna.com' ), Ebersberg, als Lyophilisat bezogen, in hochreinem Wasser entsprechend der Herstellerangaben zu 400µM Lösungen gelöst und bei -20°C gelagert.

##### NQO1-ARE

```
>tccaaatcgagtcacagtgactcagcagaatc<
<aggtttagcgctcagtgctcactgagtcgtcttag<
```

##### ARE2'

```
>gtccgtgctaactcagaattccagttcagaatg<
<caggcacgattgagtccttaaggtcaagtccttac<
```

##### ARE4'

```
>gcgtgcagcaggtgtgcatgactagctctgggc<
<cgacgctcgtccacacgtactgatcgagacccg<
```

##### ARE1'

```
>cagaagctcaggtgaagctgacacggccatagt<
<gtcttcgagtcacttcgactgtgccggtatca<
```

##### ARE3'

```
>atTTTTGCCAAGTCAGACAGAAGTTGTGGGTAAG<
<taaaaacggttcagtcctgtcttcaacaccatt<
```

##### ARE5'

```
>atgtctgcctgctcaagaaggtggacctgagct<
<tacagacggacgagttcttccacctggactcga<
```

#### 2.9.1.2 Hybridisierung

Um eine möglichst vollständige Umwandlung zu DNA-Doppelsträngen zu erreichen, wurden die jeweils komplementären Einzelstränge in hohen Konzentrationen eingesetzt und mit einem Temperaturgradient ( im PCR-Thermocycler ) hybridisiert.

##### Lösungen, Puffer

Bezeichnung	Komponente	Konzentration	Bemerkung
5×TNE-Puffer	Tris	50 mM	606mg / 100ml bei 121,1 g/mol
	NaCl	500 mM	2,92g / 100ml bei 58,4 g/mol
	EDTA	5 mM	2,0ml 0,25M EDTA-Lsg. / 100ml
	HCl	pH 7,8	
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad	100 ml

##### Arbeitsprotokoll

Arbeitsschritt	Komponente	Stamm-Konz.	End-Konz.	Vol.
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	-	-	44 µl
	TNE-Puffer	5×	1×	16 µl
	'sense'-Oligo.	400 pmol/µl	50 pmol/µl	10 µl
	'antisense'-Oligo.	400 pmol/µl	50 pmol/µl	10 µl
- in PCR-Cups pipettieren :				80 µl
- inkubieren :	5min 94°C -- 80°C -- 60min mit -1°C/min -- 20°C			
	ds-DNA		50 pmol/µl 1,0 µg/µl	80 µl

#### 2.9.1.3 <sup>32</sup>P-Markierung

Die 'T4-Polynukleotidkinase' katalysiert die Übertragung der γ-Phosphatgruppe von ATP ( unter Bildung von ADP ) auf die 5'-OH-Gruppe von DNA-Enden und vice versa.

**Material :** 'Polynucleotide Kinase FPLCpure Cloned T4' ( enthaltene Komponenten : Enzym, 10×'One-Phor-All Buffer PLUS' ) : Pharmacia Biotech, Freiburg ;  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  : Amersham, Braunschweig

### Arbeitsprotokoll

Arbeitsschritt	Komponente	Stamm-Konz.	End-Konz.	Vol.
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	-	-	12,5
	PNK-Puffer	10×	1×	2,5
	ds-DNA	1,0 pmol/μl 20 ng/μl	100 fmol/μl	2,5
	Polynukleotid-Kinase	~ 8 units/μl	~0,8 units/μl	2,5
- in PCR-Cups vorlegen :				20,0
- zupipettieren	$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$	2,0 pmol/μl	400 fmol/μl <sup>1)</sup>	5,0
- inkubieren 40min 37°C				25,0
	EDTA	0,25 M	0,5μmol / 1,0μl PNK-Puffer	2,5
- zupipettieren	TE-Puffer	1×	ca. 1×	80,0
markierte ds-DNA			2,5 fmol/μl 0,5 ng/μl	100,0

1) ATP-Moleküle und phosphorylierbare 5'-OH-Gruppen befinden sich demnach in einem stöchiometrischen Verhältnis von 2:1.

### 2.9.1.4 Aufreinigung

Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe einer Gelausschluß-Chromatographie. Die verwendeten Säulen waren für den Einsatz in Zentrifugen mit Ausschwing-Rotor konzipiert und erlaubten damit eine schnelle Aufarbeitung.

**Material :** 'NICK Spin Columns' : Pharmacia Biotech, Freiburg

### Arbeitsprotokoll

- Herstellen des Gelbettes :** Man schüttelte das in den beidseitig verschlossenen Säulen als Suspension vorliegende Gelmaterial gründlich auf und ließ es dann in den aufrecht platzierten Säulen absetzen. Ggf. durch vorsichtige Stöße den Einschluß von Luftblasen verhindern.
- Äquilibrieren :** Zunächst den oberen, dann den unteren Verschuß entfernen und das Gel trockenlaufen lassen ( in 15ml-Zentrifugenröhrchen ). 2 Mal 1 ml TE-Puffer auftragen und trockenlaufen lassen
- Überschüssigen Puffer entfernen :** Säule in 15ml-Zentrifugenröhrchen in Zentrifuge mit Ausschwing-Rotor plazieren ( ggf. mit Gegengewichten ), 4 min bei 500×g ( 1700rpm bei 15 cm ) zentrifugieren. Eluat verwerfen.
- Probe auftragen :** Säulen senkrecht aufstellen, Proben sehr langsam auf die Geloberfläche aufbringen ( sollte nicht durch Kapillarkräfte entlang der Säulenwand oder entlang Rissen im Gelbett nach unten gesogen werden ).
- Aufgereinigtes Eluat sammeln :** 1,5ml-Eppendorfcup in das 15ml-Zentrifugenröhrchen geben, mit Probe beschickte Säule darüber plazieren, zentrifugieren wie oben. Säule entfernen, das Eppendorfcup dem Zentrifugenröhrchen entnehmen ( mit Pinzette ; enthält die aufgereinigte Probe )

## 2.9.2 Herstellung von Kernextrakten

Die beschriebene Methode ( nach Okey A.B. et al, 1979 ; modifiziert nach Miller A.G., 1983 und Whitlock J.P.Jr., 1984 ) zeichnet sich dadurch aus, daß die isolierten Kerne äußerst schnell in das letztendlich den Kernextrakt aufnehmende Medium überführt werden ( vgl. Dignam J.D. et al, 1983 ). Dies erscheint aufgrund der rasch erfolgenden Abgabe von Kernproteinen an umgebendes wässriges Medium ( Paine P.L. et al., 1983 ) von Vorteil. Durch den Verzicht auf eine abschließende Dialyse bzw. Sucrosegradient-Zentrifugation konnte außerdem die vom Zeitpunkt des Erntens der Zellen bis zur Einlagerung der gewonnenen Kernextrakte vergehende Zeitspanne auf weniger als 4 h gebracht werden.

Für Caco-2/TC7-Zellkulturen wurden 8-10 10cm-Zellkultur-Schalen pro Behandlungsgruppe eingesetzt. Die hier angegebenen Lösungs- und Puffer-Volumen reichen für ca. 20 solcher Kulturschalen.

**Geräte :** Dounce-Homogenisator ( Stempel Typ B ) : B.Braun Melsungen AG, Melsungen ; Eppendorf-Ultrazentrifuge 'Beckman Optima TL', 'Microfuge Tube 357448' ( Polyallomer ) : Beckman, München .

### Lösungen, Puffer

Bezeichnung	Komponente	Konzentr.	Bemerkung
Quell-Lösung	HEPES NaOH	10 mM pH 7,6	596mg / 250 ml bei 238,3 g/mol
DTT-Lösung	Dithiothreitol	1,0 M	154mg / 1,0 ml bei 154,2 g/mol ; frisch herst.
PefaBloc-Lsg.	PefaBloc	10 mg/ml	in PSC-Protector-Lsg. ; frisch herstellen
Aprotinin-Lsg.	Aprotinin	1,0 mg/ml	in PBS-Puffer ; bei -20°C lagern
Leupeptin-Lsg.	Leupeptin	1,0 mg/ml	in PBS-Puffer ; bei -20°C lagern
Pepstatin-Lsg.	Pepstatin	1,0 mg/ml	in Ethanol ; bei -20°C lagern
MDH-Stammlsg.	MgCl <sub>2</sub> HEPES NaOH	3 mM 25 mM pH 7,6	122mg / 200ml bei 203,3 g/mol 1,19g / 200ml bei 238,3 g/mol
MDH-Lösung ( frisch herstellen )	MDH-Stammlsg. DTT PefaBloc Aprotinin Leupeptin Pepstatin	- 1 mM 100 µg/ml 2,0 µg/ml 2,0 µg/ml 2,0 µg/ml	- 50 µl DTT-Lösung / 50ml 500 µl PefaBloc-Lsg. / 50ml 100µl Aprotinin-Lsg. / 50ml 100µl Leupeptin-Lsg. / 50ml 100µl Pepstatin-Lsg. / 50ml
Extr.-Stammlsg.	KCl HEPES KOH H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	800 mM 50 mM ph 7,6 ad	2,98g / 50ml bei 74,56 g/mol 596mg / 50ml bei 238,3 g/mol 40ml / 50ml
2×Extraktions-Lsg. ( frisch herstellen )	Extr.-Stammlsg. Dithiothreitol PefaBloc Aprotinin Leupeptin Pepstatin Glycerol	- 2 mM 200 µg/ml 4,0 µg/ml 4,0 µg/ml 4,0 µg/ml 20%	4,0ml / 5ml 10µl DTT-Lösung / 5ml 100µl PefaBloc-Lsg. / 5ml 20µl Aprotinin-Lsg. / 5ml 20µl Leupeptin-Lsg. / 5ml 20µl Pepstatin-Lsg. / 5ml 1,0ml / 5ml

HEPES = 2[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure : Serva, Heidelberg ; DTT = Dithiothreitol, Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, Glycerol ( für Molekularbiologie ) : Sigma-Aldrich, St.Louis

( USA ) ; PefaBloc ( Phenylmethansulfonylfluorid-Derivat ) : Roche Molecular Biochemicals, Mannheim.

### Arbeitsprotokoll

1. **Vorbereitung** : Alle Geräte und Lösungen auf 4°C vortemperieren.
2. **Waschen** : Zell-Kulturen auf Eis stellen, 2 Mal mit PBS-Puffer waschen
3. **Quellen** : mit Quell-Lösung überschichten ( ca. 10ml pro Platte ), 15 min inkubieren
4. **Zellen sammeln** : Lösung absaugen, Zellrasen mit MDH-Lösung in Zentrifugenröhrchen überführen ( ca. 1,5ml MDH-Lösung pro Platte, in 15ml-Zentrifugenröhrchen sammeln ), 10 min bei 500×g zentrifugieren ( 2000 rpm bei 11,5 cm ), Überstand verwerfen
5. **Zellen aufschließen** : Pellet zu Suspension mit 10-20×10<sup>6</sup> Zellen pro ml suspendieren ( Caco-2/TC7 : 1,0 ml pro Platte ), mit Dounce-Homogenisator, Stempel Typ B ( "fester Sitz" ), in 15 Hüben vorsichtig aufschließen.
6. **Kern-Isolierung** : 2 min bei 1000×g zentrifugieren ( 2800 rpm bei 11,5 cm ), Pellet wie oben suspendieren, 4 min bei 1000×g zentrifugieren, Überstand jeweils verwerfen
7. **Kern-Lyse** : Pellet mit gleichem Volumen 2×Extraktionslösung in Ultrazentrifugations-taugliche Eppendorf-Cups überführen ( zum Abschätzen des Volumens mit pipettierten Volumen in baugleichem Zentrifugenröhrchen vergleichen ; das Pellet nach Möglichkeit ohne Schütteln oder mehrmaliges Auf- und Abpipettieren überführen, dabei ausfallendes Material erschwert den Vorgang erheblich ), 30 min auf Eis bei 250 rpm im Schüttler inkubieren.
8. **Kernprotein-Isolierung** : 45 min bei 100.000×g zentrifugieren ( Eppendorf-Ultrazentrifuge ), Überstand vorsichtig in neues Gefäß überführen.
9. **Einlagern** : Überstand sorgfältig mischen, in kleinen, genau abgemessenen Aliquoten bei -70°C einlagern ( nach Protein-Bestimmung eines Aliquots kann dann durch Zugabe eines entsprechenden Volumens 1×Extraktionslösung die Konzentration aller Aliquote auf 5,0 mg/ml eingestellt werden, ohne daß diese vollständig aufgetaut werden müßten ).

### Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Protein-Konzentrationen der Kernextrakte wurde nach Bradford photometrisch bestimmt ( Bradford, M.M., 1976 ; modifiziert ).

**Material** : 'Bio-Rad Protein Assay' : BioRad, München

### Arbeitsprotokoll

Die Probe wurde in Eppendorfcups vorgelegt, mit Wasser auf 800µl aufgefüllt, mit 200µl Bradford-Reagenz versetzt und gründlich gemischt. Nach 10 min maß man die Absorption bei 595 nm.

### Auswertung

Der Proportionalitätsfaktor der Messung wurde mit Hilfe einer Eichgeraden bestimmt. Die Proteinkonzentration ergab sich ( mit  $\Delta A$  : Absorption nach Abzug des durchschnittlichen Blindwerts ) nach :

$$\text{Protein-Konzentration} = 42 \text{ mgProtein/ml} \times \frac{\Delta A_{595\text{nm}} / [ \text{OD} ]}{\text{Volumen( Probe )} / [ \mu\text{l} ]}$$

## 2.9.3 Vorinkubation und Elektrophorese

### 2.9.3.1 Inkubation

Der 'Shift-Puffer' wurde so gestaltet, daß zusammen mit den bereits im Kern-Extrakt enthaltenen Komponenten die gewünschten Endkonzentrationen erreicht wurden.

**Material :** poly[dIdC] : Roche Molecular Biochemicals, Mannheim ; Kompetitor : vgl. 2.9.1 ; Antikörper ( für Gel-Supershift-Studien ) Nrf1 'sc-721 X', Nrf2 'sc-722 X', c-Maf 'sc-7866 X', c-Jun 'sc-7481 X', Jun B 'sc-46 X', Jun D 'sc-74 X', c-Fos 'sc-52 X', Fra-1 'sc-605 X', Fra-2 'sc-604 X' : Stanta Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg .

#### Lösungen, Puffer

Komponente	End-Konz.	Kern-Extrakt [0,25]	4× Shift-Puff. [0,25]	Bemerkung
HEPES	20 mM	25 mM	55 mM	656mg / 50ml bei 238,3 g/mol
KCl	120 mM	400 mM	80 mM	298mg / 50ml bei 74,56 g/mol
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	-	20 mM	203mg / 50ml bei 203,3 g/mol
KOH	pH 7,6	pH 7,6	pH 7,6	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	-	-	ad	35ml / 50ml Stamm-Lsg. lagern bei 4°C ; erst unmittelbar vor Gebrauch zugeben :
Glycerol	10 %	10 %	30 %	300µl Glycerol + 700µl Stamm-Lösung
DTT	1,0 mM	1,0 mM	3,0 mM	3,0 µl 1M DTT-Lsg. / 1,0 ml ;

In eckigen Klammern die Volumenanteile der Puffer bzw. Lösungen im Gesamtansatz. Konzentrationen im 4×Shift-Puffer berechnet nach :  $[ c(\text{End-Konz.}) - 0,25 \times c(\text{Kern-Extrakt}) ] \div 0,25$ . Komponenten : vgl. 2.9.2 .

#### Arbeitsprotokoll

Arbeitsschritt	Komponente	Stamm-Konz.	End-Konz	Vol. [µl]
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	-	-	ad
	Shift-Puffer	4×	1×	5,0
	poly[dIdC]	1,0 µg/µl	100 ng/µl	2,0
	Kern-Extrakt	5 µg/µl	1,25 µg/µl	5,0
	Kompetitor	20 µg/µl	1,0 µg/µl	1,0
	Sonde	500 ng/µl	25 ng/µl	1,0
- Inkubieren :	30min 20°C			
- Zupipettieren :	Antikörper	2,0 µg/µl	0,50 µg/µl	5,0
- Inkubieren :	90min 4°C -- 15min 20°C			
- Auf Geltaschen auftragen, dort weitere 15 min belassen				
Gesamtansatz				20,0

### 2.9.3.2 Gelelektrophorese

Zur Trennung wurde ein Polyacrylamidgel eingesetzt. Man stellte das Gel - bis auf eine Spacer-Dicke von 1,5 mm und einem Vernetzungsgrad von 4% - wie in 2.4.4.3 beschrieben her, führte die Elektrophorese unter Kühlung bei 6 V/cm ( 200V / 33 cm ) 75 min durch, trocknete das Gel und dokumentierte das Ergebnis.

**Lösung :**

Volumen	Komponente
65,6 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ( möglichst gasfrei, nicht aus Spritzflaschen )
20,0 ml	5×TBE-Puffer
13,3 ml	'Rotiphorese <sup>R</sup> Gel 30' ( 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid )
100 µl	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
1,0 ml	10%-ige ( w/v ) Ammoniumpersulfat-Lösung ( unmittelbar vor Gebrauch hergestellt )

## 2.10 Daten-Verarbeitung

Aufarbeitung der Rohdaten des Multititerplatten-Readers : eigenes Programm .

Gensequenzen : 'GenBank', '<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ; Extraktion von Sequenzen aus Html-Dateien, Sequenz-Verarbeitung ( Invertieren, Komplementär-Sequenz, Ausschnitte, Formatierung ) : eigene Programme .

Übereinstimmungs-Analyse ( 'Alignment' ) : 'Align v.1.01', Dos ; Suche nach homologen Gensequenzen : 'Blast', '<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> ; Aufarbeitung 'Blast'-Daten, Abgleich der Hybridisierungs-Temperaturen von Primern, Möglichkeit der Bildung von Primer-Concatemeren : eigene Programme ; mRNA-Sekundärstruktur : 'RNA-Draw v.1.0', Windows 3.1 .

Datenbank Restriktions-Endonukleasen : 'ReBase', '<http://www.neb.com/rebase/> ; Aufarbeitung 'ReBase'-Daten, Restriktions-Analyse, Konstrukt-Erstellung : eigene Programme .

Datenbank Transkriptions-Faktoren und -Elemente : 'TransFac', '<http://transfac.gbf.de/> ; Aufarbeitung 'TransFac'-Daten, Suche nach Sequenz-Motiven : eigene Programme ;

'Phosphor Image'-Datendokumentation : 'BasRead v2.9' ; Analyse von Radiographien : 'Tina 2.0', Windows 3.1 ; Aufarbeitung 'Tina'-Daten : eigenes Programm .

Archivierung von Http-Daten, Literatur-Verwaltung : eigene Programme .

Betriebssystem : 'OS/2 v4' ; Textverarbeitung : 'Papyrus v8.23p' ; Bildverarbeitung : 'ImPos 2.0e' ; Bildbetrachtung : 'PmView 2000 v2.31' ; Tabellenkalkulation, Diagrammerstellung, Vektorgrafik : 'Xact v7.05' ; PostScript-Druck : 'Generic PostScript Printer v30.734' ; PDF-Erstellung : 'GsView v4.0' und 'GhostScript 7.00'

Eigene Programme wurden in 'Rexx' oder 'C++' ( Entwicklung-Umgebung : 'VisualAge C++ 4.0' ) erstellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Vorversuche zur Antioxidantientyp-Induktion von UGT- und Chinonreduktase-Aktivitäten in verschiedenen Zellmodellen

#### 3.1.1 Antioxidantientyp-Induktion in Caco-2- und HepG2-Zellen

##### 3.1.1.1 Antioxidantientyp-Induktion der Chinonreduktase-Aktivität in der menschlichen Hepatom-Zelllinie HepG2

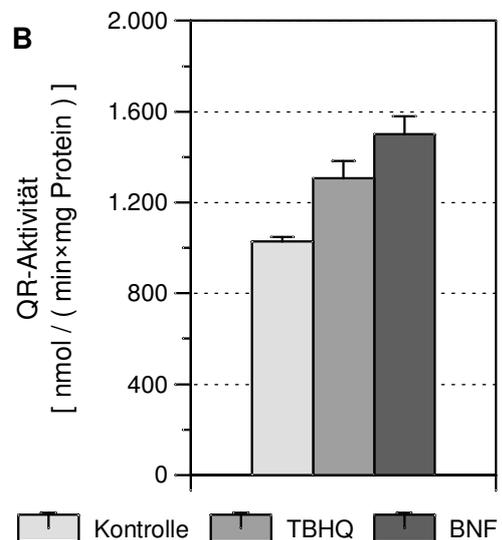
Mit der HepG2 wurde eine Hepatom-Zelllinie menschlichen Ursprungs überprüft. In dieser Zelllinie ist außerdem die ARE-vermittelte Induktion der Chinonreduktase und auch anderer Enzyme bereits gut untersucht ( z.B. Venugopal R., Jaiswal A.K., 1996 ).

**A**

Behandl.-gruppe	Chinonreduktase-Aktivität [ nmol / ( min×mgProt. ) ]	Induktionsfaktor
Kontrolle	1030 ± 20	-
TBHQ	1310 ± 80	1,27
BNF	1500 ± 80	1,46

**Abb. 14** : Einfluß einer 48-stündigen Behandlung mit 80 µM TBHQ bzw. 50 µM BNF auf die Chinonreduktase-Aktivität ( Mittelwerte ± SD, n = 3 ) und die sich ergebenden Induktionsfaktoren in der menschlichen Hepatom-Zelllinie HepG2. **A**) : Tabellarische Darstellung. **B**) : Graphische Darstellung.

**B**



In der menschlichen Hepatomzelllinie HepG2 führt *tert*-Butylhydrochinon ( TBHQ ) bzw.  $\beta$ -Naphthoflavin ( BNF ) ausgehend von sehr hoher basaler Aktivität nur zu einer geringen Erhöhung der Enzym-Aktivität ( Abb. 14, Induktionsfaktor 1,27 bzw. 1,46 ).

##### 3.1.1.2 Antioxidantientyp-Induktion der Chinonreduktase-Aktivität in der menschlichen Colonkarzinom-Zelllinie Caco-2/TC7

Neben der Leber ebenfalls maßgeblich am "First-Pass"-Metabolismus von Fremdstoffen beteiligt ist der Darm. Im TC7 Klon der menschlichen Colonkarzinom-Zelllinie Caco-2 ( von der heterogenen Zelllinie Caco-2 wurden mehrere Klone mit unterschiedlicher Enzymausstattung isoliert, vgl. 1.5 ) konnte eine verhältnismäßig hohe und durch monofunktionale Induktoren deutlich induzierbare UGT1A6-Aktivität nachgewiesen werden ( Münzel P.A. et al., 1999 ). Er bietet sich insofern als Modellsystem für die Untersuchung der Induktion der UGT1A6 durch Induktoren des Antioxidantien-Typs an.

Die Chinonreduktase-Aktivitäten im Gesamthomogenat unbehandelter als auch mit 48 h mit 80 µM TBHQ bzw. 50 µM BNF behandelter Caco-2/TC7 Zellkulturen befinden sich unterhalb der Nachweisgrenze von 30 nmol/(min×mg Protein). Diese Ergebnisse für den TC7-Klon

stimmen mit dem Befund überein, daß die Stamm-Zelllinie Caco-2 homozygot für das NQO1\*2-Allel ist ( Bonnesen C. et a., 2001 ). Die auf eine Basensubstitution folgende Veränderung eines Aminosäure-Restes in diesem Allel ( 187S->P ) führt zu einem instabilen Protein und somit nicht mehr nachweisbaren Chinonreduktase-Aktivitäten ( vgl. auch Karczewski J.M. et al., 1999 ).

### 3.1.1.3 Antioxidantientyp-Induktion der UGT-Aktivität in der menschlichen Hepatom-Zelllinie HepG2

Die UGT-Enzymaktivitäten in unbehandelten als auch 48 h mit 80  $\mu$ M TBHQ bzw. 50  $\mu$ M BNF behandelten Kulturen der menschlichen Hepatom-Zelllinie HepG2 befinden sich unterhalb der - sich bei Anpassung der Testbedingungen an für Caco-2/TC7-Zellkulturen übliche Aktivitäten ergebenden - Nachweisgrenze von 0,8 nmol/(min $\times$ mg Protein). Damit weist der untersuchte Klon der HepG2-Zelllinie einerseits sehr hohe basale Chinonreduktase-Aktivitäten, andererseits jedoch allenfalls geringe UGT-Aktivitäten auf.

### 3.1.1.4 Antioxidantientyp-Induktion der UGT-Aktivität in der menschlichen Colonkarzinom-Zelllinie Caco-2/TC7

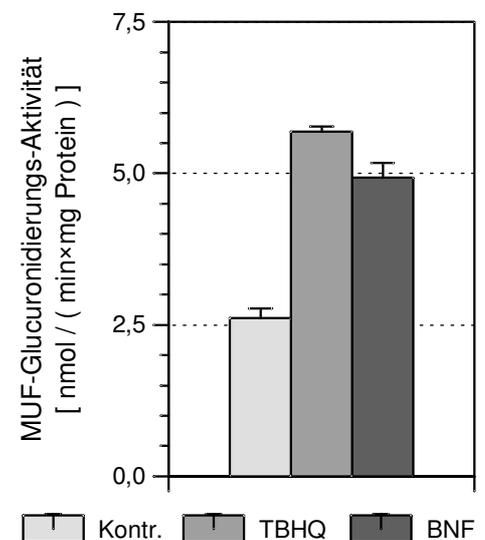
#### Vergleich der Enzym-Induktion durch TBHQ und BNF

**A**

Behandlungsgruppe	UGT-Aktivität [ nmol/( min $\times$ mg Prot. ) ]	Induktionsfaktor
Kontrolle	2,6 $\pm$ 0,2	-
TBHQ	5,7 $\pm$ 0,1	2,18
BNF	4,9 $\pm$ 0,2	1,89

**Abb. 15 :** Einfluß einer 48-stündigen Behandlung mit 80  $\mu$ M TBHQ bzw. 50  $\mu$ M BNF auf die UGT-Aktivität in Caco-2/TC7 Zellkulturen ( Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 2 ). **A)** : Tabellarische Darstellung. **B)** : Graphische Darstellung. ( Die gegenüber Abb. 16 geringeren UGT-Aktivitäten sind Folge des zwischenzeitlichen Einfrierens des Zellmaterials bei -20°C ).

**B**



Nach 48 h Behandlung mit 80  $\mu$ M TBHQ bzw. 50  $\mu$ M BNF lassen Kulturen der menschlichen Darm-Zelllinie Caco-2/TC7 eine Induktion der UGT-Aktivität um etwa den Faktor 2 erkennen ( Abb. 15, Induktionsfaktor 2,2 bzw. 1,9 ).

Damit finden sich beim Caco-2/TC7 Zellklon meßbare UGT-Aktivitäten, aber keine nachweisbaren Chinonreduktase-Aktivitäten.

#### Zeitverlauf der TBHQ-Induktion der UGT-Aktivität und Einfluß des TBHQ auf das Zellwachstum

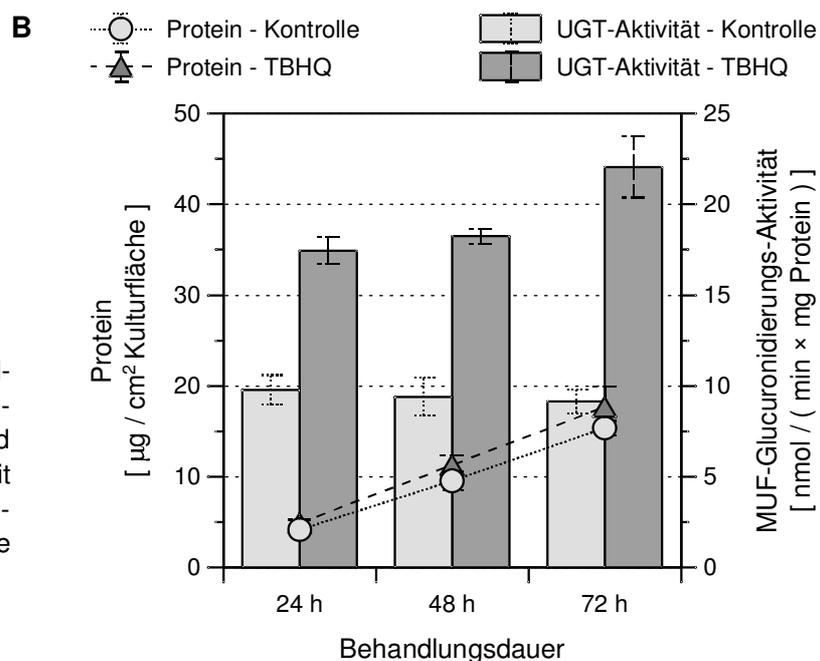
Bereits nach 24 h Behandlung mit 80  $\mu$ M TBHQ zeigt sich bei der Caco-2/TC7 Zelllinie eine deutliche Induktion der UGT-Aktivität ( Abb. 16 ). Der hierbei auftretende Induktionsfaktor von 1,8 steigt im Verlaufe weiterer 2 Tage noch auf 2,4.

Im Gegensatz zur Hepa1c1c7-Zelllinie, bei der bereits bei einer 24-stündigen Behandlung mit 30  $\mu$ M TBHQ eine deutliche Abnahme der Proteinmenge pro Kulturfläche zu beobachten war

(Abb. 17B), findet hier während des gesamten untersuchten Zeitraums keine TBHQ-bedingte Verminderung der Proteinsynthese statt.

**A**

Behandlungsdauer	Protein [ $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ Kulturfläche ]		UGT-Aktivität [ $\text{nmol} / (\text{min} \times \text{mg Protein})$ ]		
	Kontrolle	TBHQ	Kontrolle	TBHQ	Indukt.faktor
24 h	4,2 $\pm$ 0,4	4,9 $\pm$ 0,4	9,8 $\pm$ 0,8	17,5 $\pm$ 0,7	1,79
48 h	9,5 $\pm$ 1,0	11,3 $\pm$ 1,0	9,4 $\pm$ 1,1	18,3 $\pm$ 0,4	1,94
72 h	15,4 $\pm$ 0,8	17,7 $\pm$ 2,2	9,2 $\pm$ 0,7	22,1 $\pm$ 1,7	2,41



**Abb. 16** : Einfluß einer Behandlung mit 80  $\mu\text{M}$  TBHQ auf die Proteinmenge pro Kulturfläche und die UGT-Aktivität in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer in Kulturen der Caco-2/TC7 Zelllinie ( Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 3$  ).

**A)** : Tabellarische Darstellung.

**B)** : Graphische Darstellung.

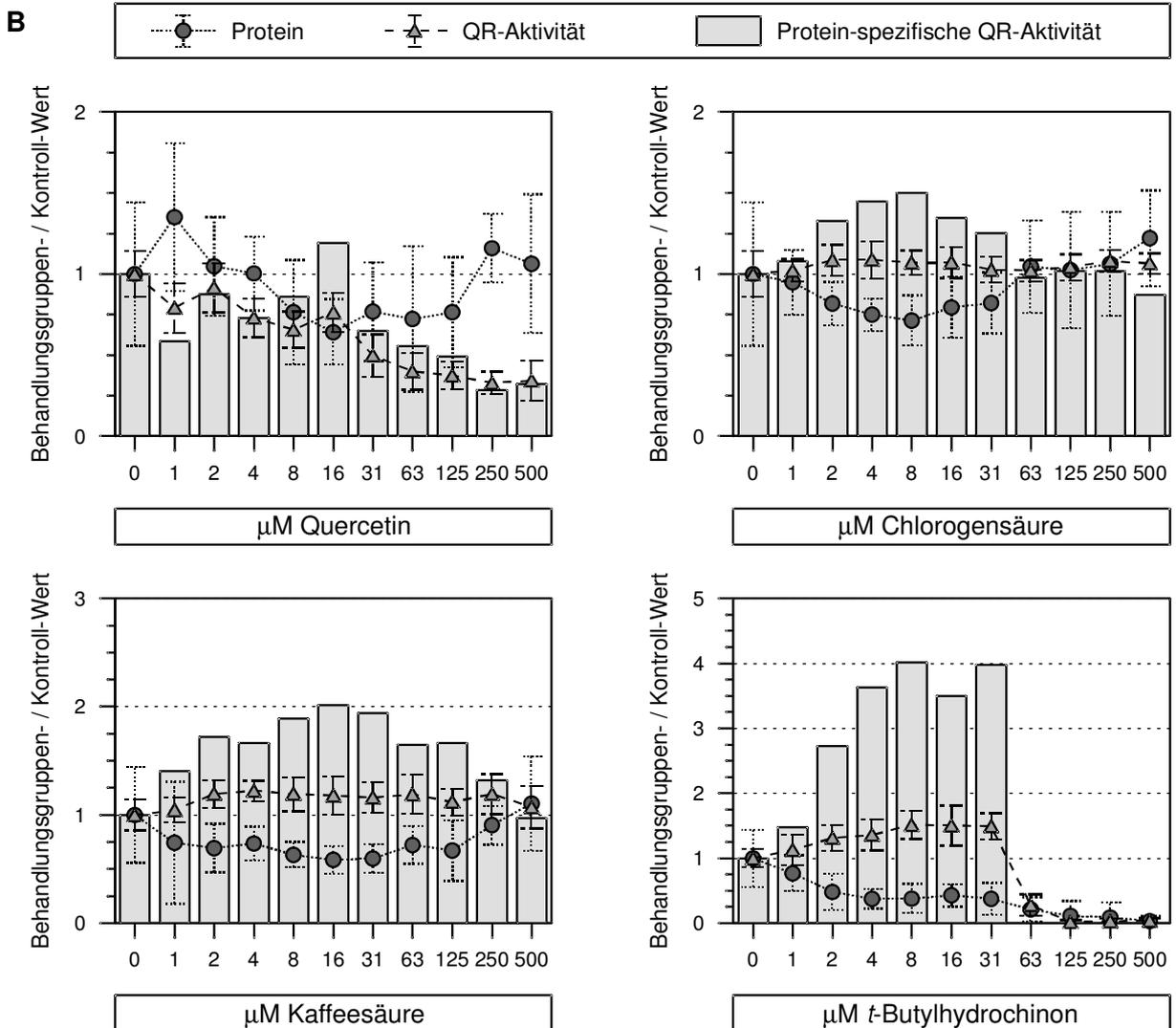
### 3.1.2 Chinonreduktase-Screeningtest : Antioxidantientyp-Induktion in der Mäusehepatom-Zelllinie Hepa1c1c7

Die NAD(P)H:Chinon Oxidoreduktase der Mäusehepatom-Zelllinie Hepa1c1c7 war eines der ersten Enzyme, das zum Vergleich des Induktionspotentials verschiedenster monofunktionaler Induktoren verwendet wurde ( Talalay P. et al., 1988 ). Da außerdem hohe Induktionsfaktoren erreicht werden, eignet sich dieses System besonders gut für das Screening auf potentielle Auslöser dieses Signalwegs und wurde im Rahmen dieser Arbeit dazu verwendet, unter einigen bekannten Induktoren den wirksamsten und potentesten zu selektieren.

Während in der Mäusehepatom-Zelllinie Hepa1c1c7 Quercetin bei 24-stündiger Behandlung keine Enzyminduktion erkennen läßt, führte Chlorogen- und Kaffesäure zu einer schwachen und TBHQ zu einer deutlichen Erhöhung der Enzym-Aktivität ( Abb. 17A ). Maximale Induktionsfaktoren werden bereits bei einer Wirkstoffkonzentration von 8  $\mu\text{M}$  ( Chlorogensäure, TBHQ ) bzw. 16  $\mu\text{M}$  ( Kaffesäure ) Wirkstoff-Konzentration erreicht. Wesentliche cytotoxische Wirkung zeigte einzig TBHQ oberhalb einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$ .

Die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen basalen ( 106  $\text{nmol}/[\text{min} \times \text{mg Protein}]$  ) und maximal induzierten ( 422  $\text{nmol}/[\text{min} \times \text{mg Protein}]$  ) Protein-spezifischen Aktivitäten stimmen gut mit den in der Literatur aufgeführten Werten überein ( 104 bzw. 355  $\text{nmol}/[\text{min} \times \text{mg Protein}]$  ; Prochaska H.J., Santamaria A.B., 1988 ).

A	Einzelwert	Berechnungsgrundlage	$\Sigma$ -Lw	$\Sigma$ -0
	Protein-Rohwert MV [ mOD ]		104.4	399.0
	Protein-Rohwert SD [ mOD ]		10.4	130.0
	Protein-Rohwert rSD [ % ]	Protein-Rohwert SD $\div$ Protein-Rohwert MV	10.0	32.6
	Protein [ mOD ]	Protein-Rohwert - Protein-Rohwert( $\Sigma$ -Lw)	0	295
	Protein relativ [ 1 ]	Protein $\div$ Protein( $\Sigma$ -0)	0.00	1.00
	QR-Aktivität-Rohwert MV [ $\Delta$ mOD/15min ]		53.6	194.1
	QR-Aktivität-Rohwert SD [ $\Delta$ mOD/15min ]		4.4	20.1
	QR-Aktivität-Rohwert rSD [ % ]	QR-Aktivität-Rohwert SD $\div$ QR-Aktivität MV	8.2	10.4
	QR-Aktivität [ $\Delta$ mOD/15min ]	QR-Aktivität-Rw. - QR-Aktivität-Rw.( $\Sigma$ -Lw)	0	141
	QR-Aktivität relativ [ 1 ]	QR-Aktivität $\div$ QR-Aktivität( $\Sigma$ -0)	0.00	1.00
	Protein-spezif. QR-Aktivität [ 1/15min ]	QR-Aktivität $\div$ Protein		0.48
	Protein-spezif. QR-Akt. [ nmol/(min $\times$ mg) ]	Protein-spezif. QR-Akt. $\times$ 3345 nmol/mg		106
	Protein-spezif. QR-Aktivität relativ [ 1 ]	Pr.-sp.QR-Akt. $\div$ Pr.-sp.QR-Akt.( $\Sigma$ -Lw)		1.00



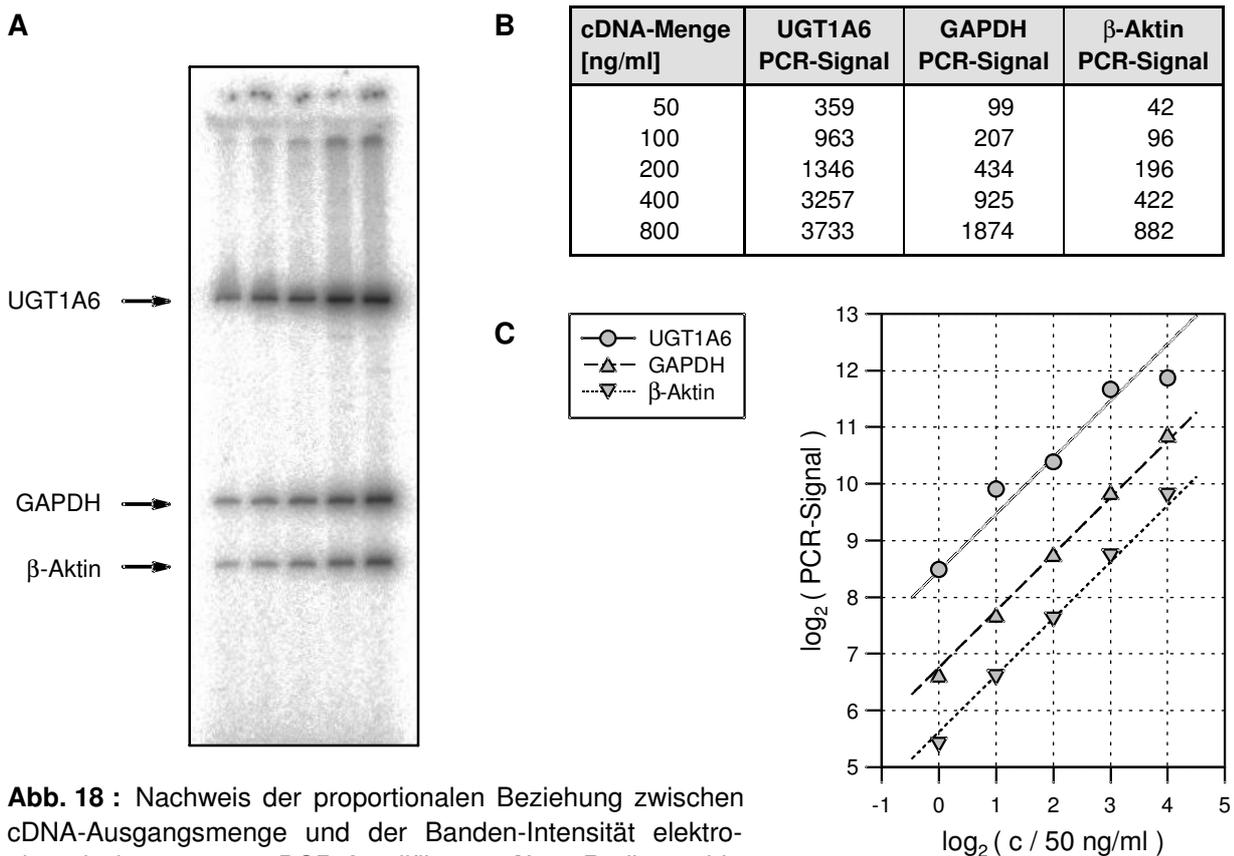
**Abb. 17** : Induktion der Chinonreduktase- ( QR- ) Aktivität in der Mäusehepatom-Zelllinie Hepa1c1c7 ( Chinonreduktase-Screeningtest ) bei 24-stündiger Behandlungsdauer. **A** ) : Tabellarische Darstellung der relevanten Einzelwerte und deren Berechnungsgrundlage. Konkrete Daten sind für die zusammengefaßten, auf allen Multititerplatten durchgeführten Bestimmungen der Reagenzien-Blindwerte ( $\Sigma$ -Lw ) und Kontroll-Zellkulturen ( $\Sigma$ -0 ) aufgeführt (  $n = 24$  ) ; diese wurden dann als gemeinsame Grundlage für die Berechnung einzelner Behandlungsgruppen (  $n = 8$  ) übernommen. MV = Mittelwert, SD = Standardabweichung. **B** ) : Graphische Darstellung der relativen Proteinmenge pro Kulturplatte, Chinonreduktase-Aktivität und Protein-spezifischen Chinonreduktase-Aktivität in Abhängigkeit von den Konzentrationen an Quercetin, Chlorogensäure, Kaffeesäure und TBHQ im Kulturmedium.

## 3.2 Antioxidantientyp-Induktion der UGT1A6-mRNA-Expression

### 3.2.1 Quantifizierung der UGT1A6-mRNA-Expression mittels Triplex-RT-PCR

Die Regression der Wertepaare von cDNA-Ausgangsmengen und den sich ergebenden Bandenintensitäten der elektrophoretisch getrennten PCR-Amplifikate ( Abb. 18C, nach  $y = A \times x$  -->  $\log_2(y) = \log_2(A) + \log_2(x)$  Linie mit Steigung 1 in der doppellogarithmischen Darstellung) ergibt Korrelationskoeffizienten von 0,960 ( UGT1A6 ), 0,998 ( GAPDH ) und 0,996 (  $\beta$ -Aktin ) und bestätigt damit die proportionale Beziehung zwischen PCR-Signal und cDNA-Ausgangsmenge.

Bei der höchsten cDNA-Ausgangskonzentrationen von 0,8 ng/ $\mu$ l deutet sich für die Amplifikation der UGT1A6 der Übergang von der logarithmischen in die lineare Phase an, was in wiederholten Experimenten bestätigt werden konnte ( Daten nicht gezeigt ). Die Vorvermehrung des UGT1A6-Amplifikats wurde deshalb in späteren PCR-Analysen von 11 Zyklen auf 9 Zyklen reduziert ( bei gleichbleibender Zyklenanzahl nach Zugabe der  $\beta$ -Aktin- und GAPDH-Primer von 19 ).



**Abb. 18** : Nachweis der proportionalen Beziehung zwischen cDNA-Ausgangsmenge und der Banden-Intensität elektrophoretisch getrennter PCR-Amplifikate. **A** ) : Radiographie von 5 elektrophoretisch getrennten PCR-Ansätzen mit logarithmisch aufsteigender cDNA-Ausgangsmenge. **B** ) : PhosphorImager-Auswertung des Gels. **C** ) : Auftragung der Werte in doppellogarithmischer Darstellung und Regressionsgeraden.

### 3.2.2 Zeitverlauf der UGT1A6-mRNA-Induktion durch TBHQ und BNF

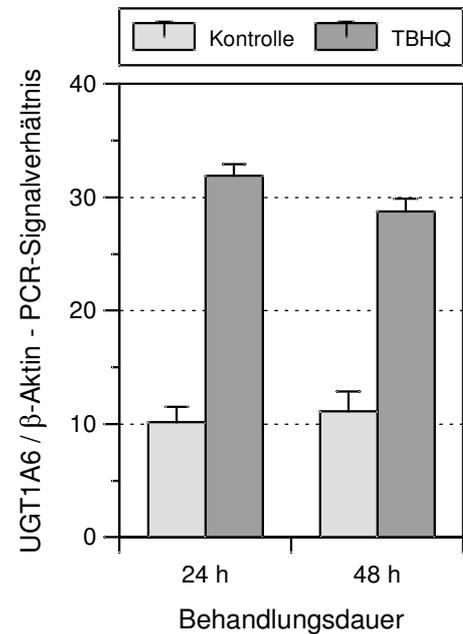
A

Behandlungsdauer TBHQ	GAPDH / $\beta$ -Aktin PCR-Signalverhältnisse		
	Kontrolle	TBHQ	Indukt.fakt.
24 h	1,41 $\pm$ 0,07	1,37 $\pm$ 0,02	0,97
48 h	1,75 $\pm$ 0,01	1,57 $\pm$ 0,05	0,90
Behandlungsdauer TBHQ	UGT1A6 / $\beta$ -Aktin PCR-Signalverhältnisse		
	Kontrolle	TBHQ	Indukt.fakt.
24 h	10,2 $\pm$ 1,4	31,9 $\pm$ 1,1	3,14
48 h	11,1 $\pm$ 1,8	28,8 $\pm$ 1,1	2,59

**Abb. 19** : Einfluß einer 24- bzw. 48-stündigen Behandlung mit 80  $\mu$ M TBHQ auf die UGT1A6-mRNA-Expression in Caco-2/TC7 Zellkulturen ( Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 3 ). **A** ) : PCR-Signalverhältnisse und sich ergebende Induktionsfaktoren. **B** ) : Graphische Darstellung der UGT1A6/ $\beta$ -Aktin-PCR-Signalverhältnisse.

Es wurde mit UGT1A6-Primern in 11 Zyklen vorvermehrt und nach Zugabe von GAPDH- und  $\beta$ -Aktin-Primern in weiteren 19 Zyklen amplifiziert.

B



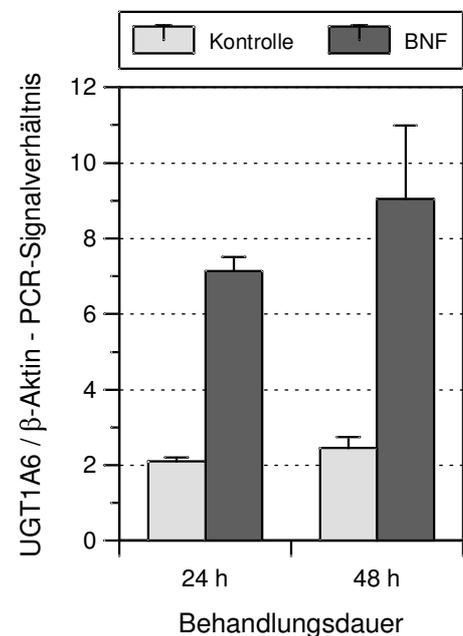
A

Behandlungsdauer BNF	GAPDH / $\beta$ -Aktin PCR-Signalverhältnisse		
	Kontrolle	BNF	Indukt.fakt.
24 h	1,30 $\pm$ 0,02	1,32 $\pm$ 0,01	1,01
48 h	1,74 $\pm$ 0,04	1,86 $\pm$ 0,05	1,07
Behandlungsdauer BNF	UGT1A6 / $\beta$ -Aktin PCR-Signalverhältnisse		
	Kontrolle	BNF	Indukt.fakt.
24 h	2,11 $\pm$ 0,10	7,14 $\pm$ 0,38	3,39
48 h	2,46 $\pm$ 0,29	9,04 $\pm$ 1,95	3,67

**Abb. 20** : Einfluß einer 24- bzw. 48-stündigen Behandlung mit 50  $\mu$ M BNF auf die UGT1A6-mRNA-Expression in Caco-2/TC7 Zellkulturen ( Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 2 ). **A** ) : PCR-Signalverhältnisse und sich ergebende Induktionsfaktoren. **B** ) : Graphische Darstellung der UGT1A6/ $\beta$ -Aktin-PCR-Signalverhältnisse.

Hier wurde mit UGT1A6-Primern in 9 Zyklen vorvermehrt und nach Zugabe der GAPDH- und  $\beta$ -Aktin-Primer in weiteren 19 Zyklen amplifiziert. Dementsprechend finden sich gegenüber den mit 11 Zyklen Vorvermehrung durchgeführten Versuchen etwa um den Faktor 2<sup>2</sup> kleinere Verhältniszahlen bei den Kontrollen.

B



Ausgehend von ähnlichen Induktionsfaktoren nach 48-stündiger Behandlung ( TBHQ : 3,1, Abb. 19A ; BNF : 3,4, Abb. 20A ) scheint eine längere Behandlungsdauer bei TBHQ eher zu abnehmenden, bei BNF eher zu zunehmenden Induktionsfaktoren ( 3,7 ) zu führen. Die

mRNA-Expression unbehandelter Zellkulturen bleibt über den beobachteten Zeitraum weitgehend konstant.

Die GAPDH/ $\beta$ -Aktin-Verhältnisse werden weder von einer Behandlung mit TBHQ noch mit BNF maßgeblich beeinflusst, die "Induktionsfaktoren" bewegen sich um 1,0 ( 0,97 und 0,90 bei TBHQ-Behandlung, Abb. 19A ; 1,01 und 1,07 bei BNF-Behandlung, Abb. 20A ). Eine exakt gleichsinnige Veränderung der mRNA-Expression von  $\beta$ -Aktin, einem Strukturprotein des Cytoskeletts, und GAPDH, einem Glykolyse-Enzym, durch TBHQ bzw. BNF ist jedoch äußerst unwahrscheinlich. Man kann dementsprechend von einer konstitutiven Expression beider Gene ausgehen und die Tauglichkeit der  $\beta$ -Aktin-mRNA-Menge als Bezugsgröße als überprüft und bestätigt ansehen.

### 3.2.3 Vergleich der UGT1A6-mRNA-Induktion durch TBHQ und BNF

Die 48-stündige Behandlung mit 50  $\mu$ M BNF führt zu einem deutlich höheren Induktionsfaktor ( 4,3, Abb. 21A ) als diejenige mit TBHQ ( 2,3 ). Der sich anhand der in Abb. 19 und Abb. 20 andeutende unterschiedliche Zeitverlauf der mRNA-Induktion durch BNF und TBHQ wird damit zusätzlich gestützt.

Die "Induktionsfaktoren" der GAPDH/ $\beta$ -Aktin-Verhältnisse bewegen sich um den Faktor 1,0 ( Abb. 21A ).

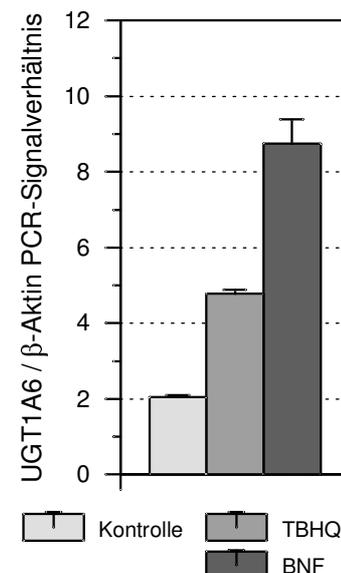
**A**

Behandl.-gruppe	GAPDH / $\beta$ -Aktin		UGT1A6 / $\beta$ -Aktin	
	Signalverh.	Indukt.fakt.	Signalverh.	Indukt.fakt.
Kontrolle	1,74 $\pm$ 0,00	-	2,06 $\pm$ 0,05	-
TBHQ	1,71 $\pm$ 0,00	0,98	4,77 $\pm$ 0,11	4,26
BNF	1,97 $\pm$ 0,07	1,13	8,75 $\pm$ 0,64	2,32

**Abb. 21** : Einfluß einer 48-stündigen Behandlung mit 80  $\mu$ M TBHQ bzw. 50  $\mu$ M BNF auf die UGT1A6-mRNA-Expression in Caco-2/TC7 Zellkulturen ( Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 3 ). **A** ) : PCR-Signalverhältnisse und die sich ergebenden Induktionsfaktoren. **B** ) : Graphische Darstellung der UGT1A6/ $\beta$ -Aktin-PCR-Signalverhältnisse.

Hier wurde in 9 Zyklen mit UGT1A6-Primern vorvermehrt und dann, nach Zugabe von GAPDH- und  $\beta$ -Aktin-Primern, für weitere 11 Zyklen amplifiziert.

**B**



## 3.3 Transkriptionelle Regulation der UGT1A6

### 3.3.1 ARE-ähnliche Motive

#### in der regulatorischen Sequenz der UGT1A6

#### 3.3.1.1 Ermittlung einer 'Antioxidant Response Element'-Konsensus-Sequenz

Angesichts der Vielzahl an Mitgliedern in den Familien der Faktoren, für die eine Beteiligung an ARE-bindenden Komplexen nachgewiesen wurde ( NF-E2, Jun, Fos, Maf, vgl. Abb. 32 ), erscheint es möglich, daß abhängig von den Bedingungen ( Gewebe, flankierende Sequen-

zen im jeweiligen Gen, Typ des monofunktionalen Induktors ) unterschiedliche Kriterien für eine Bindung existieren. Es sollte deshalb versucht werden, durch eine Homologie-Analyse eine - alle Übereinstimmungen in bisher eingegrenzten Kernsequenzen ( Rushmore T.H. et al., 1991 ; Favreau L.V., Pickett C.B., 1995 ) und identifizierten AREs ( vgl. Itoh K. et al., 1997 ; Mulcahy R.T. et al., 1997 ) zusammenfassende - Konsensus-Sequenz zu ermitteln.

Eine Homologie-Analyse verschiedener funktioneller und potentieller ARE-Sequenzen ( Abb. 22 ) gemeinsam mit Reporter-Gen-Analysen mit punktmutierten ARE-Sequenzen ( Rushmore T.H. et al., 1991, Favreau L.V., Pickett C.B., 1995 ) weist die Basenabfolge 'TGAnnnGC' als absolut notwendig aus. Jede Änderung in diesen Basen hat einen drastischen Abfall der basalen Expressions-Aktivität und/oder der Induzierbarkeit zur Folge.

Im weiteren ist die dieser Sequenz unmittelbar folgende Base immer und die unmittelbar vorhergehende fast immer ein Purin ( A/G ), außerdem folgt der Abfolge 'TGA' meist ein Cytosin. Bei den erwähnten Mutationsanalysen wurden jedoch einerseits nur 'A->G' und 'G->A'-Transversionen durchgeführt ( die nur geringe Auswirkungen auf das Verhalten der Sequenzen hatten ) und andererseits die fragliche Cytosin-Base immer durch Adenin ersetzt, was mit einem weitgehendem Verlust basaler und induzierter Expression einherging. Adenin als vierte Base kann daher ausgeschlossen werden, Thymin und Guanin als vierte Base sowie führende und folgende Pyrimidine dahingegen nicht.

Darüber hinaus gehende Motive, wie z.B. die im 5' Bereich der GST-Ya und der NQO1 enthaltenen AP-1-ähnlichen Elemente, sind in anderen funktionellen AREs nicht enthalten und wurden deshalb nicht aufgenommen. Die sich ergebende ARE-Konsensus-Sequenz lautet dementsprechend 'TGA(C/G/T)nnnGC'.

**Abb. 22 :** Homologie-Analyse funktioneller und potentieller AREs, ARE-Konsensus-Sequenzen und potentielle AREs im Bereich des UGT1A6-Promotors.

ARE-Sequenzen, deren Funktionalität bereits nachgewiesen wurde ( Absatz ganz oben ) bzw. die von verschiedenen Autoren als solche klassifiziert wurden ( zweiter Absatz ). Die "ARE-Konsensus-Sequenz" ( s.u. ) ist durch fette Großbuchstaben, benachbarte AP-1-ähnliche Sequenzen nur durch Großbuchstaben hervorgehoben. Enzyme : GST = Glutathion-S-Transferase, Ya-, P-, PiA- oder PiB-Isoform ; NQO = NAD(P)H:Chinon Oxidoreduktase, Isoform 1 bzw. 2 ; GCS =  $\gamma$ -Glutamylcystein Synthetase, katalytische ( h ) bzw. regulatorische ( l ) Untereinheit. Spezies : Kleinbuchstaben vor dem Enzym-Kürzel, r = Ratte, m = Maus, h = Mensch. ( Literatur vgl. 1.4.4 bzw. mHO-1 : Prester T. et al. 1995 ; mGST-P : Xu X., Stambrook P.J., 1994 ; hNQO2 : Jaiswal A.K., 1994a. )

Darunter ARE-Konsensus-Sequenzen nach Rushmore T.H. et al., 1991 ( Kons.1 ), Wasserman W.W., Fahl W.E., 1997a ( Kons.2 ) und Itoh K. et al., 1997 ( Kons.3 ). Aus den einheitlich angegebenen Basen ergibt sich die ARE-Konsensus-Sequenz 'TGA(C/T/G)nnnGC'.

Eine Suche nach dieser Basenabfolge in der Umgebung des UGT1A6-Promotors lieferte die im letzten Absatz aufgeführten "ARE-ähnlichen" Motive ARE1', 2', 3' und 5', eine Suche mit veränderter Länge des "Zwischenstücks" 'nnn' zusätzlich das ARE4' in unmittelbarer Umgebung des XREs der UGT1A6 ( vgl. Abb. 32 ).

rGST-Ya	TGGCATTgctaataagg <b>TGAC</b> aaa <b>GC</b> aactt
mGST-Ya	TGACATTgctaataagg <b>TGAC</b> aaa <b>GC</b> aactt
rNQO1	agtctAGAGTCacag <b>TGAC</b> ttg <b>GC</b> aaaat
hNQO1	aaatcGCAGTCAcag <b>TGAC</b> tca <b>GC</b> agaat
hGCSH	cgcaccgcctccccg <b>TGAC</b> tca <b>GC</b> gcttt
hGCS1	tttcttgggaagacaa <b>TGAC</b> taa <b>GC</b> agaaa
mHO-1	agaggggaacagaggg <b>TGAC</b> tca <b>GC</b> aaaat
mGST-Pa	ttctctccaacgtgt <b>TGAG</b> tca <b>GC</b> atccg
mGST-Pb	ctctctccaacgtgt <b>TGAG</b> tca <b>GC</b> atccg
rGST-P	agtagTCAGTCActa <b>TGAT</b> tca <b>GC</b> aacaa
hNQO2	gcaggTGACTGCaaa <b>TGAG</b> gtg <b>GC</b> agaag
Kons. 1	<sup>g</sup> <b>TGAC</b> . . . <b>GC</b>
Kons. 2	<sup>t</sup> <sub>a</sub> . . . <sup>g</sup> <sub>a</sub> <b>TGA</b> <sup>C</sup> <sub>T</sub> . . . <b>GC</b> <sup>aaaa</sup> <sub>gtttt</sub>
Kons. 3	<b>TGA</b> <sup>C</sup> <sub>G</sub> . . . <b>GC</b> <sup>a</sup> <sub>g</sub>
ARE1'	agctcaggtgaaagc <b>TGAC</b> acg <b>GC</b> catag
ARE2'	ttctgaactgaattc <b>TGAG</b> tta <b>GC</b> acgga
ARE3'	cccacaacttctgtc <b>TGAC</b> ttg <b>GC</b> aaaaa
ARE4'	ccagccaggtgtgca <b>TGAC</b> t a <b>GC</b> tctgg
ARE5'	tcaggtccaccttct <b>TGAG</b> cag <b>GC</b> agaca

### 3.3.1.2 Motive mit ARE-Konsensus-Sequenz im regulatorischen Bereich der UGT1A6

Eine Suche im regulatorischen Bereich der UGT1A6 nach Motiven mit der ARE-Konsensus-Sequenz ( Abb. 22 bzw. 32A ) ergab die "ARE-ähnlichen Motive" 1' ( Position -213 bis -205 ), 2' ( -477 bis -485 ), 3' ( -584 bis -592 ) und 5' ( -1824 bis -1832 ), eine Suche mit veränderter Länge des "Zwischenstücks" 'nnn' zusätzlich das ARE4' ( Position -1483 bis -1476 ) in unmittelbarer Umgebung des XREs der UGT1A6.

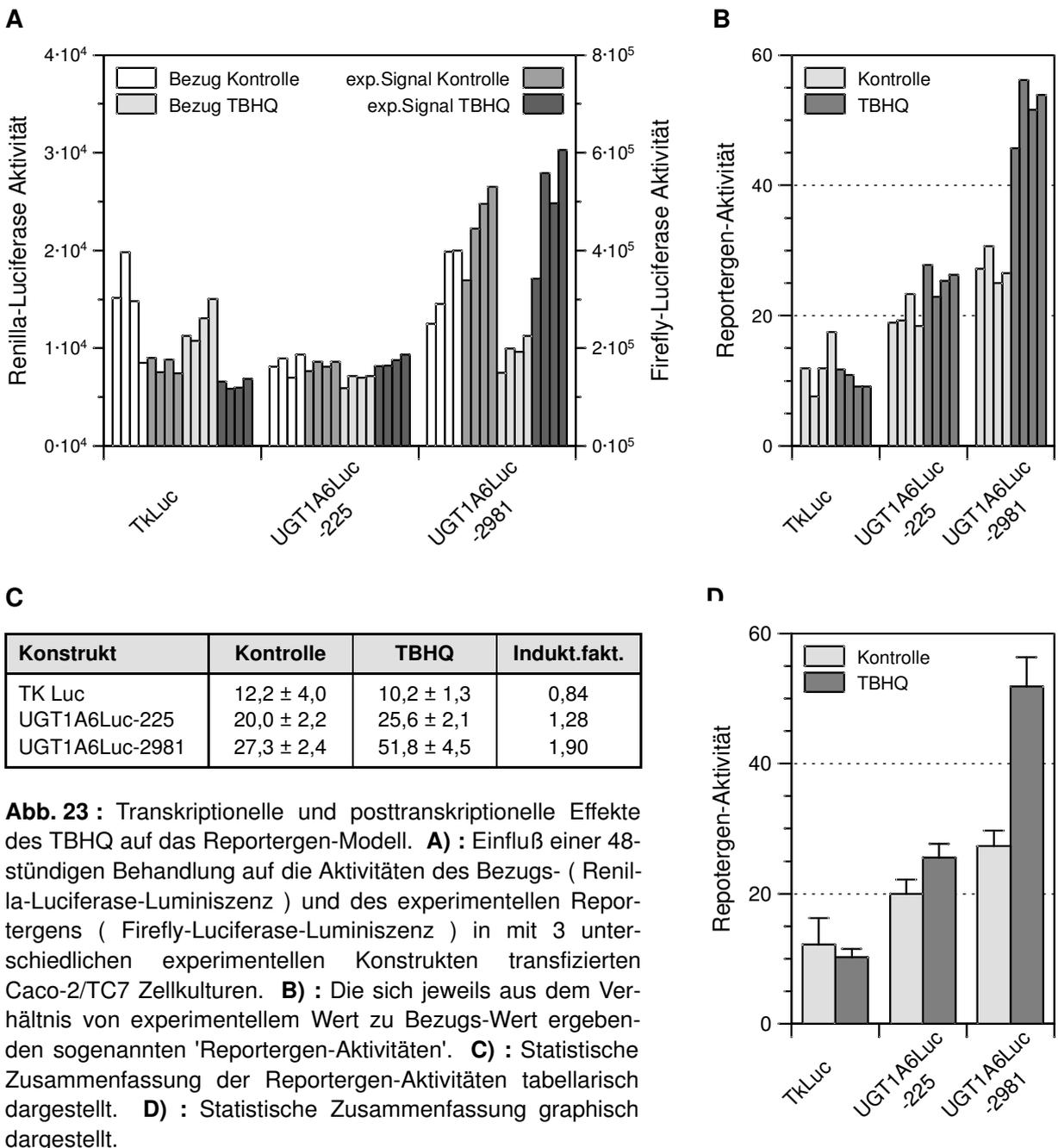
Die ARE-ähnlichen Motive 2', 3' und 5' entsprechen der Konsensus-Sequenz 3 ( Itoh K. et al., 1997 ) vollständig, das ARE3' zusätzlich der ausgedehnten Konsensus-Sequenz 2 ( Wasserman W.W., Fahl W.E., 1997a ) bis auf 2 Basen-Substitutionen ( Abb. 22 ). Das ARE1' stimmt aufgrund führender und folgender Pyrimidine mit keiner der veröffentlichten Konsensus-Sequenz überein. Das ARE4' entspricht ebenfalls keiner der Konsensus-Sequenzen, besitzt jedoch eine gewisse AP-1-Ähnlichkeit ( nach 'Transfac'-Datenbank, vgl. Abb. 32, 100% Übereinstimmung bezüglich Kernsequenz und ca. 90% bezüglich flankierender Sequenz ).

### 3.3.2 Funktionalität der ARE-ähnlichen Motive

#### 3.3.2.1 Transkriptionelle und posttranskriptionelle Effekte des TBHQ auf das Reportergergen-Modell

Das TkLuc-Konstrukt ( vgl. auch Abb. 26 ), das sich mit dem Thymidinkinase Promotor des Herpes Simplex Virus unter der selben transkriptionellen Kontrolle wie das Bezugs-Reportergergen befindet, weist keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellkulturen auf ( Abb. 23C/D ).

Im Rahmen des gleichen Versuchs führt die Behandlung mit TBHQ dahingegen beim UGT1A6Luc-225-Konstrukt zu einer leichten und beim UGT1A6Luc-2981-Konstrukt zu einer deutlichen Erhöhung dieses Verhältnisses ( Abb. 23C/D, Induktionsfaktor 1,3 bzw. 1,9 ).



Regulatorische Gensequenzen der experimentellen Konstrukte : TkLuc : Herpes Simplex Virus Thymidinkinase Promotor ; UGT1A6Luc-255 : regulatorische Sequenz der UGT1A6 bis Nukleotid -225 ; UGT1A6Luc-2981 : entsprechend bis Nukleotid -2981.

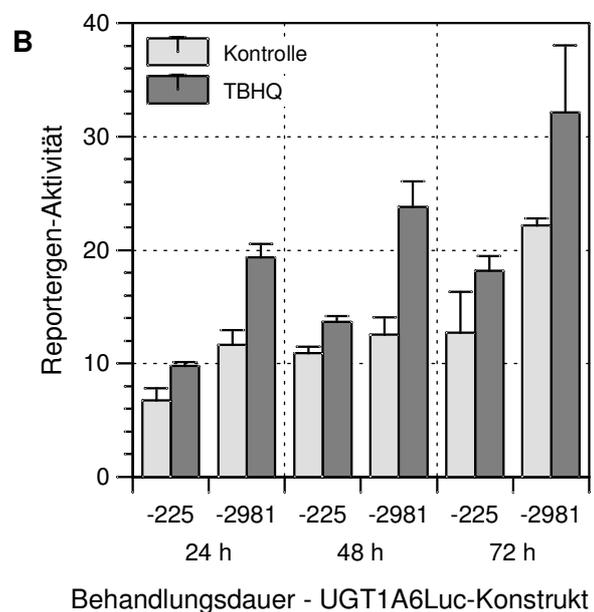
### 3.3.2.2 Zeitverläufe der Transkriptions-Aktivierung durch TBHQ und BNF

Der Zeitverlauf der Transkriptions-Aktivierung des UGT1A6Luc-2981-Konstrukts durch TBHQ läßt ein Optimum der Induzierbarkeit bei 48-stündiger Behandlungsdauer erkennen ( Abb. 24A, Induktionsfaktor 1,90 ). Gleichzeitig führt bei dieser Behandlungsdauer die Einbeziehung der regulatorischen Sequenz zwischen Nukleotid -225 und -2981 zu einer deutlichen Steigerung der Induzierbarkeit ( Faktor 1,26 zu 1,90 ) - während diese bei 24-stündiger Behandlung kleiner ausfällt und bei 72-stündiger keine signifikanten Unterschiede mehr bestehen ( Faktor 1,43 zu 1,45 ). Die Induktionsfaktoren bei 48-stündiger Behandlung stimmen sehr gut mit den im Experiment der Abb. 23 nachgewiesenen Werten überein ( 1,28 und 1,90 ).

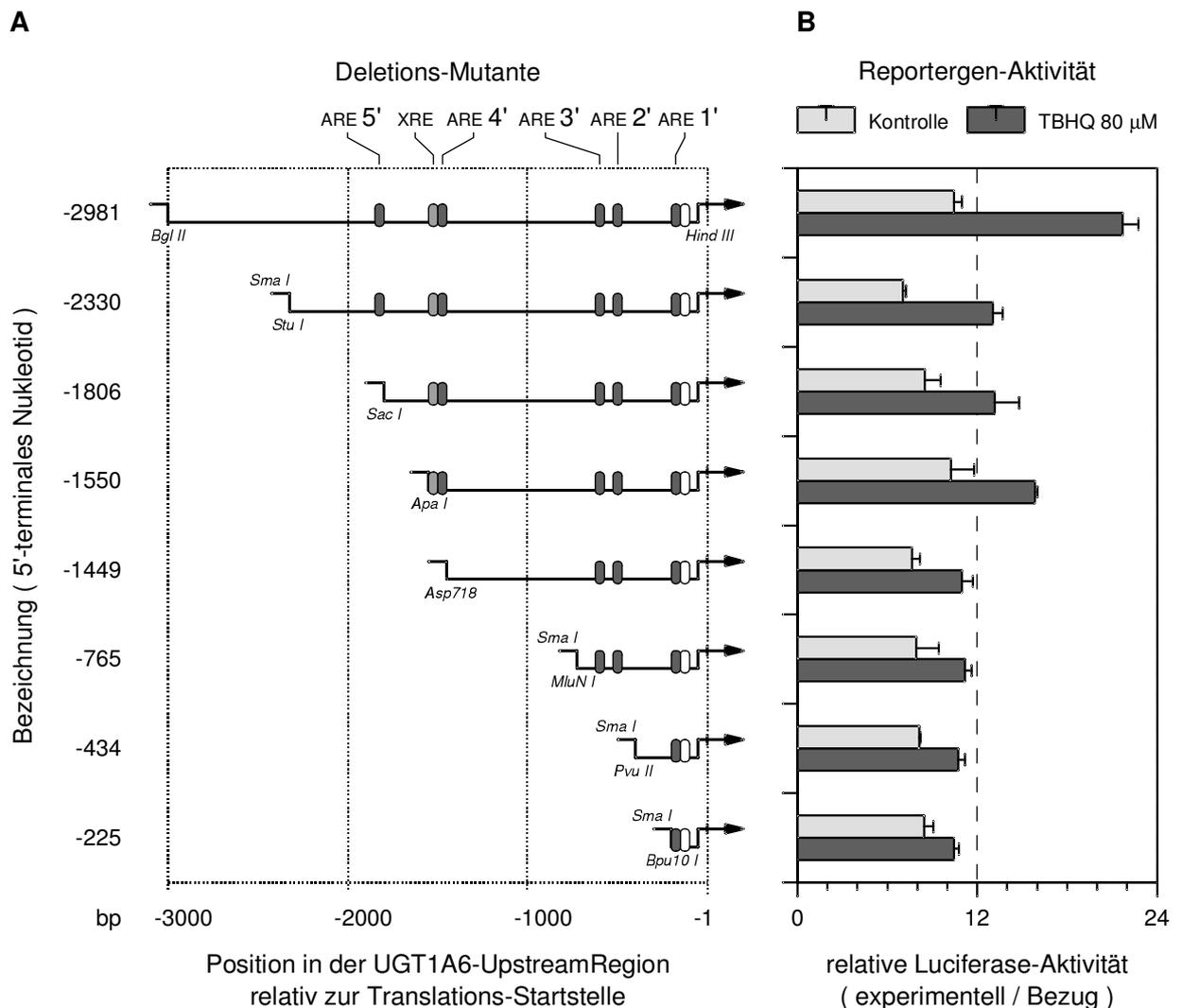
In den mit BNF behandelten Zellkulturen wurde die Messung der Reporter-gen-Aktivität des experimentellen Konstrukts beeinträchtigt - vermutlich durch Quench-Effekte des BNF wiesen die Firefly-Luminiszenzen gegenüber denen der Kontrolle und der mit TBHQ behandelten Zellkulturen um etwa den Faktor 100 niedrigere Werte auf. Deren Reporter-gen-Aktivitäten ( Abb. 24A ) sind deshalb nicht direkt mit den Werten der Kontrolle vergleichbar.

Behandl.-dauer	UGT1A6Luc-Konstrukt	Reporter-gen-Aktivität			Induktionsfaktoren	
		Kontrolle	TBHQ	BNF	TBHQ	BNF
24 h	-225	6,7 ± 1,1	9,8 ± 0,4	0,11 ± 0,03	1,46	0,016
	-2981	11,7 ± 1,3	19,4 ± 1,2	0,17 ± 0,03	1,66	0,014
48 h	-225	10,9 ± 0,6	13,7 ± 0,5	0,41 ± 0,05	1,26	0,038
	-2981	12,5 ± 1,5	23,8 ± 2,2	0,47 ± 0,04	1,90	0,038
72 h	-225	12,7 ± 3,6	18,2 ± 1,3	0,50 ± 0,24	1,43	0,039
	-2981	22,2 ± 0,6	32,1 ± 5,9	0,95 ± 0,02	1,45	0,043

**Abb. 24 :** Zeitverläufe der über die regulatorische Sequenz der UGT1A6 vermittelten Transkriptions-Aktivierung durch 80 µM TBHQ bzw. 50 µM BNF, ermittelt mittels Reporter-gen-Analyse in Caco-2/TC7 Zellkulturen nach 24-, 48- und 72-stündiger Behandlung. Die Konstrukte entsprechen den in Abb. 23 verwendeten. **A)** : Tabellarische Darstellung der Mittelwerte ± SD ( n = 3 ) und der sich ergebenden Induktionsfaktoren. **B)** : Graphische Darstellung der Kontroll- und TBHQ-Werte.



## 3.3.2.3 Deletions-Analyse des UGT1A6Luc-Reportergen-Konstrukts



**Abb. 25 :** Deletions-Analyse des UGT-1A6Luc-Reportergen-Konstrukts in unbehandelten und 42 h mit 80  $\mu$ M TBHQ behandelten Caco-2/TC7 Zellkulturen. **A)** : Schematische Darstellung der verschiedenen Deletions-Mutanten ; nach unten versetzt die jeweils in den Reportergenvektor pGL3 einklonierten Bereiche der regulatorischen Sequenz der UGT1A6, weiß = TATAA-Box, grau = XRE-Element und dunkelgrau = ARE'-Element. Zusätzlich sind die zur Erstellung der Konstrukte verwendeten Restriktions-Endonukleasen aufgeführt ( vgl. 2.6.3 )

**B)** : Graphische Darstellung der für die einzelnen Deletions-Mutanten erhaltenen basalen und TBHQ-induzierten Reportergen-Aktivitäten ( Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten, Einzelexperiment mit  $n \geq 4$  Zellkulturen ). **C)** : Tabellarische Darstellung der Reportergen-Aktivitäten und der sich ergebenden Induktionsfaktoren.

**C**

Deletions-Mutante	Reportergen-Aktivität		
	Kontrolle	TBHQ	Indukt.fakt.
-2981	10,4 $\pm$ 0,5	21,7 $\pm$ 1,0	2,08
-2330	7,0 $\pm$ 0,2	13,0 $\pm$ 0,7	1,85
-1806	8,5 $\pm$ 1,1	13,2 $\pm$ 1,6	1,56
-1550	10,2 $\pm$ 1,6	15,8 $\pm$ 0,2	1,55
-1449	7,7 $\pm$ 0,5	11,0 $\pm$ 0,7	1,44
-765	7,9 $\pm$ 1,5	11,2 $\pm$ 0,5	1,41
-434	8,1 $\pm$ 0,1	10,7 $\pm$ 0,5	1,32
-225	8,4 $\pm$ 0,6	10,5 $\pm$ 0,3	1,24

Die basalen Reportergen-Aktivitäten der Deletionsmutanten zeigen im Verlauf zunehmender Länge der regulatorischen Sequenz der UGT1A6 eine signifikante Zunahme bei Einbezie-

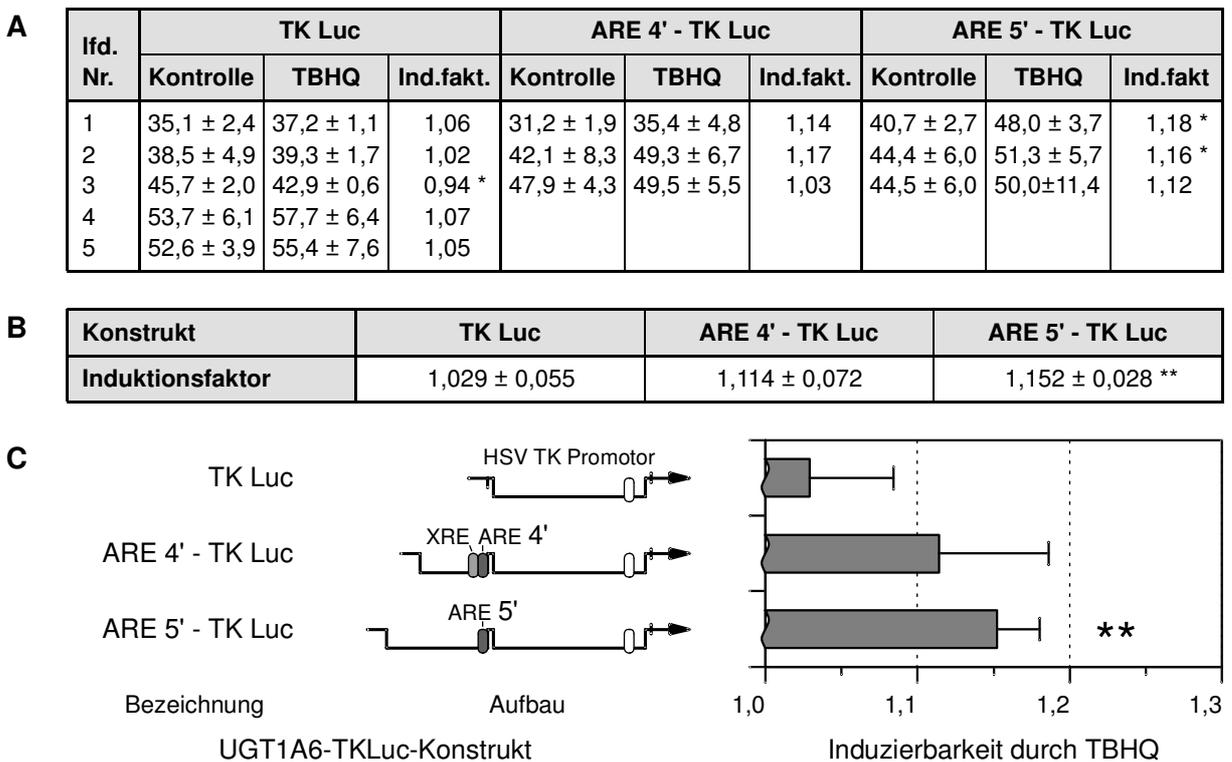
hung des Bereichs von Nukleotid -1449 bis -1550, dann eine Abnahme bei Einbeziehung der Sequenzen bis Nukleotid -1806 und schließlich wieder eine deutliche Zunahme auf den Maximalwert der Reportergergen-Aktivität unbehandelter Zellkulturen von 10,4 beim Wechsel zur Mutante mit dem größten Bereich der regulatorischen Sequenz, -2981 ( Abb. 25 ). Insgesamt zeigt sich im Vergleich zur Mutante mit dem geringsten Anteil der regulatorischen Sequenz, -225, nur eine geringe Aktivierung ( 10,4 zu 8,4 ).

Die Induktionsfaktoren zeigen zunächst im Verlauf von kurzen hin zu längeren Deletionsmutanten einen Anstieg von anfangs 1,2 auf schließlich 2,1 ( Abb. 25C ). Besonders deutliche Sprünge treten beim Übergang von Mutante -1806 auf -2330 ( von 1,56 auf 1,85, Differenz 0,29 ) und von -2330 auf -2981 ( von 1,85 auf 2,08, Differenz 0,23 ) auf. Wie bereits erwähnt, weist der unmittelbare Bereich der TATAA-Box bereits einen Induktionsfaktor von 1,24 auf ( theoretische Differenz 0,24 ).

### **3.3.2.4 Durch regulatorische Sequenzen der UGT1A6 vermittelte TBHQ-Induzierbarkeit des TK-Promotors**

Während die Behandlung mit TBHQ in mit dem Ausgangsvektor TkLuc transfizierten Zellkulturen Induktionsfaktoren um 1,0 ergeben ( Abb. 26A, 0,94 bis 1,07 ; vgl. auch Abb. 23 ), führt diese bei den - regulatorische Sequenzen der UGT1A6 enthaltenden - Konstrukten ARE4'-TkLuc und ARE5'-TkLuc zu Faktoren zwischen 1,03 und 1,17 bzw. 1,12 und 1,18. Statistische Signifikanz (  $p \leq 0,10$  ) läßt sich für die Unterschiede in den Reportergergen-Aktivitäten behandelte und unbehandelte Kulturen der einzelnen Transfektions-Ansätze in Verbindung mit dem ARE5'-TkLuc-Konstrukt nachweisen.

Auch die Zusammenfassung der Induktionsfaktoren jeweils aller mit dem selben Konstrukt transfizierten Transfektions-Ansätze ( Abb. 26B/C ) führt zu Werten, die die Unterschiede zwischen dem Ausgangs- und dem ARE4'-TkLuc- bzw. ARE5'-TkLuc-Konstrukt als unterschiedlich ausweisen ( statistisch signifikant beim ARE5'-TkLuc-Konstrukt,  $p \leq 0,05$  bei  $1,03 \pm 0,05$  gegenüber  $1,15 \pm 0,03$  ).



**Abb. 26** : Durch regulatorische Sequenzen der UGT1A6 vermittelte TBHQ-Induzierbarkeit des TK-Promotors. TK Luc = Konstrukt mit der Promotorsequenz des Herpes Simplex Virus Thymidinkinasegens ( 'HSV TK', ca. 790 bp ), diese vermittelt die konstitutive Expression des "downstream" befindlichen Reportergens. ARE4'-TKLuc = Konstrukt, das "upstream" des HSV-TK-Promotors die regulatorische Sequenz im Bereich des XRE- und des ARE4'-Elements der UGT1A6 enthält ( 354 bp ). ARE5'-TKLuc = Konstrukt, das die regulatorische Sequenz im Bereich des ARE5'-Elements der UGT1A6 enthält ( 529 bp ). **A** ) : In voneinander unabhängig durchgeführten Transfektionen ( lfd. Nr. ) gemessene Reporter-Gen-Aktivitäten un behandelter und 42 h mit 80 µM TBHQ behandelter Caco-2/TC7 Zellkulturen, jeweils Mittelwerte ± SD von 3 bis 6 Kulturen, und die sich ergebenden Induktionsfaktoren. **B** ) : Statistische Zusammenfassung jeweils aller in Verbindung mit dem selben Konstrukt erhaltenen Induktionsfaktoren. **C** ) : Graphische Darstellung der Zusammenfassung, mit schematischer Darstellung der Konstrukte.

Statistische Signifikanzen : \* :  $p < 0,10$ , \*\* :  $p < 0,05$ , im Mittelwert-t-Test bezüglich Unterschieden zwischen den Reporter-Gen-Aktivitäten behandelter und un behandelter Zellkulturen ( A ) bzw. zwischen den Induktionsfaktoren bei Konstrukten mit und ohne regulatorischer Sequenz der UGT1A6 ( B/C ).

## 3.4 GelShift-Analyse der ARE-ähnlichen Motive der regulatorischen Sequenz der UGT1A6

### 3.4.1 Sequenz-spezifische Bindung von nukleären Proteinen an die ARE-ähnliche Motive

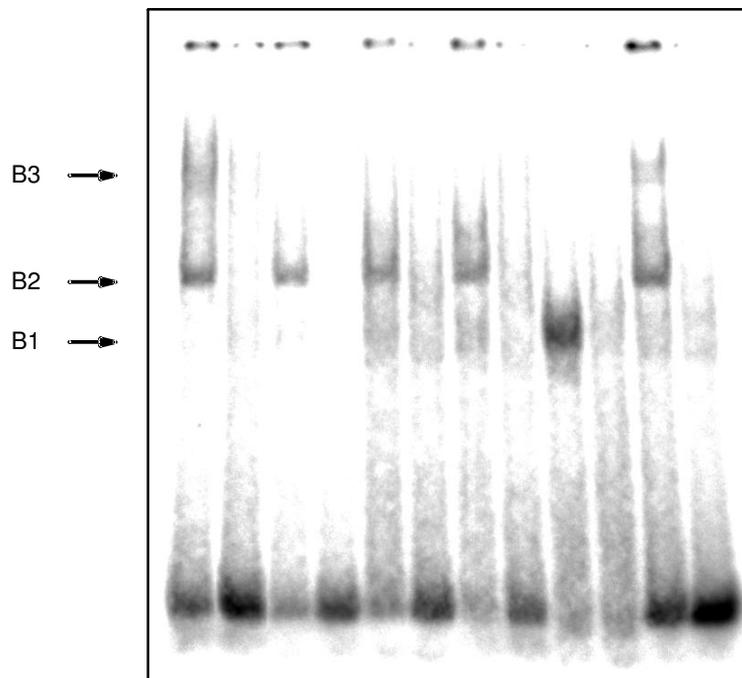
Die als Referenz dienende NQO1-ARE-Sonde führt in zwei Laufweiten-Bereichen zu Banden ( Abb. 27 ) : eine schneller wandernde, schärfere und intensivere im Bereich B2 und eine langsamer wandernde, diffusere und schwächere im Bereich B3. Identische Laufweiten der jeweils intensivsten Bande ergeben sich mit den Sonden ARE1'-, ARE2'-, ARE3'- und ARE5'. Das ARE5'-Oligonukleotid führt außerdem zu zwei sehr dicht beieinander liegenden, schwachen Banden im Laufweitenbereich B3. Die Spur der ARE4'-Sonde weist im Bereich B2 und

B3 keine Signale auf, stattdessen findet sich hier eine äußerst intensive Bande in einem Bereich schnellerer Migrations-Geschwindigkeiten, B1.

Unter den eingesetzten Versuchsbedingungen ( insbesondere Elektrophorese-Temperatur ca. 20°C ) führt der Einsatz kompetierenden unmarkierten Oligonukleotids in 40-fachem Überschuß bei allen untersuchten Sonden zum nahezu vollständigen Verschwinden von Gelshift-Banden und einer Intensivierung des Signals des freien Oligonukleotids.

Der in Verbindung mit der NQO1-ARE- und der UGT1A6-ARE5'-Sonde erprobte Wettbewerb mit einem unspezifischen 33-mer beeinflusst das Bandenmuster dahingegen nicht wesentlich. Während ein 40-facher Überschuß unmarkierten NQO1-ARE-Oligonukleotids die NQO1-ARE-Sonde wieder deutlich zu verdrängen vermag, erfolgt dies mit unmarkiertem UGT1A6-ARE5'-Oligonukleotid im Bereich B2 zu einem geringeren Ausmaß und im Bereich B3 nicht mehr maßgeblich.

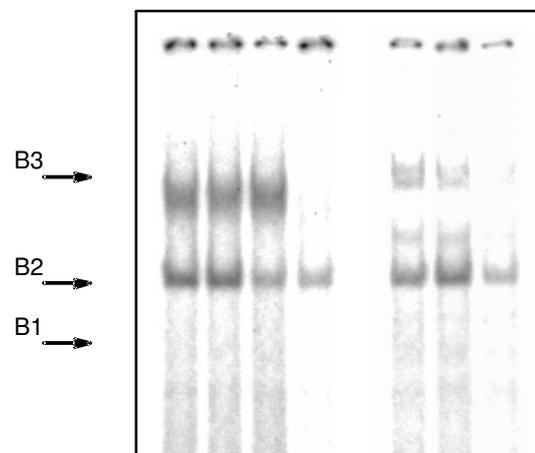
Kompetitor	NQO1		ARE1'		ARE2'		ARE3'		ARE4'		ARE5'	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+



**Abb. 27 :** Kompetierende Bindung markierter und nichtmarkierter ARE-ähnlicher Motive der regulatorischen Sequenz der UGT1A6 an nukleäre Proteine der Caco-2/TC7 Zelllinie.

Gelshift-Analyse mit (+) und ohne (-) kompetierendem nichtmarkiertem Oligonukleotid in 40-fachem Überschuß, unter Verwendung radioaktiv markierter, doppelsträngiger 33-mer ( Sequenz vgl. Abb. 22 und 2.9.1.1 ) als Sonde und nukleärer Extrakte von 42 h mit 80 µM TBHQ behandelten Caco-2/TC7 Zellkulturen. Die Elektrophorese wurde bei ca. 20°C durchgeführt.

Kompetitor	NQO1			ARE5'		
	-	ns	U	N	-	ns



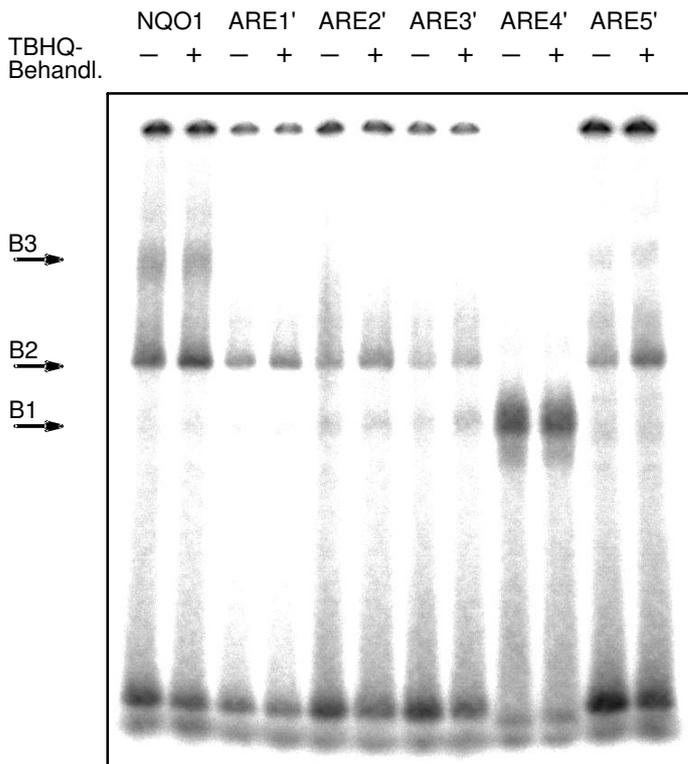
**Abb. 28 :** Sequenz-Abhängigkeit der Competition durch nichtmarkierte Oligonukleotide.

Gelshift-Analyse mit unspezifischem 33-mer ( ns ), unmarkiertem UGT1A6-ARE5'-Motiv ( U ) oder unmarkiertem NQO1-ARE-Motiv ( N ) in 40-fachem Überschuß als Kompetitor sowie ohne Kompetitor ( - ), unter Verwendung nukleärer Extrakte von 42 h mit 80 µM TBHQ behandelten Caco-2/TC7 Zellkulturen. Die Elektrophorese wurde bei ca. 15°C durchgeführt.

### 3.4.2 Wirkung des TBHQ auf die Bindung von nukleären Proteinen an ARE-ähnliche Motive

Die außer beim ARE4' zu beobachtende Zunahme des Bindungsvermögens (Abb. 29) durch die Behandlung mit TBHQ fällt im Vergleich zur Referenz NQO1 (Abb. 29B/C, Faktor 1,3) bei den sonstigen ARE-ähnlichen Motiven der regulatorischen Sequenz der UGT1A6 höher aus, wobei das ARE5' den deutlichsten Unterschied aufweist (1,8). Die Absolutwerte sind dahingegen mit dem ARE4'-Motiv am höchsten, gefolgt vom NQO1- und dem ARE1'-Motiv, fallen beim ARE2' und ARE5' etwas niedriger aus und befinden sich beim ARE3'-Motiv auf dem geringsten Niveau.

A

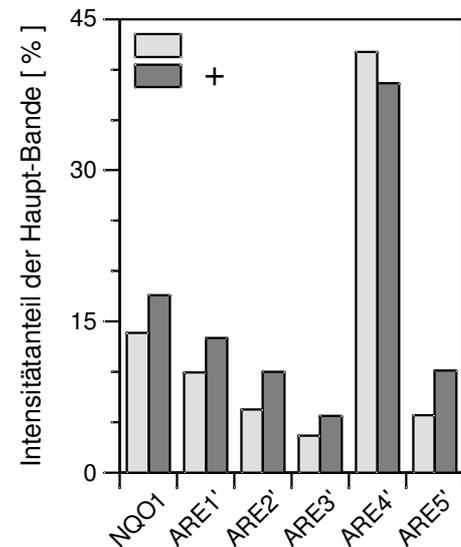


**Abb. 29** : Einfluß einer 42-stündigen Behandlung mit 80  $\mu$ M TBHQ auf die Bindung ARE-ähnlicher Motive der regulatorischen Sequenz der UGT1A6 durch nukleäre Extrakte von Caco-2/TC7 Zellkulturen. **A**) : Gelshift-Analyse des NQO1-ARE und der ARE-ähnlichen Motive der regulatorischen Sequenz der UGT1A6 mit nukleären Extrakten unbehandelter und behandelter Kulturen. Die Elektrophorese wurde bei ca. 20°C durchgeführt. **B**) : Phosphorimager-Auswertung der Intensitäten der Hauptbande (bezogen auf die Gesamt-Intensität der Spur, um Unterschiede im Markierungsgrad der Sonde zu eliminieren) und die sich ergebenden Induktionsfaktoren tabellarisch dargestellt. **C**) : Graphische Darstellung der Werte.

B

Sonde	Intensit.-Anteil Hauptbande		
	-	+	Ind.fakt
NQO1	13,88 %	17,62 %	1,27
ARE1'	9,95 %	13,38 %	1,34
ARE2'	6,28 %	10,01 %	1,59
ARE3'	3,68 %	5,65 %	1,54
ARE4'	41,75 %	38,62 %	0,93
ARE5'	5,69 %	10,15 %	1,78

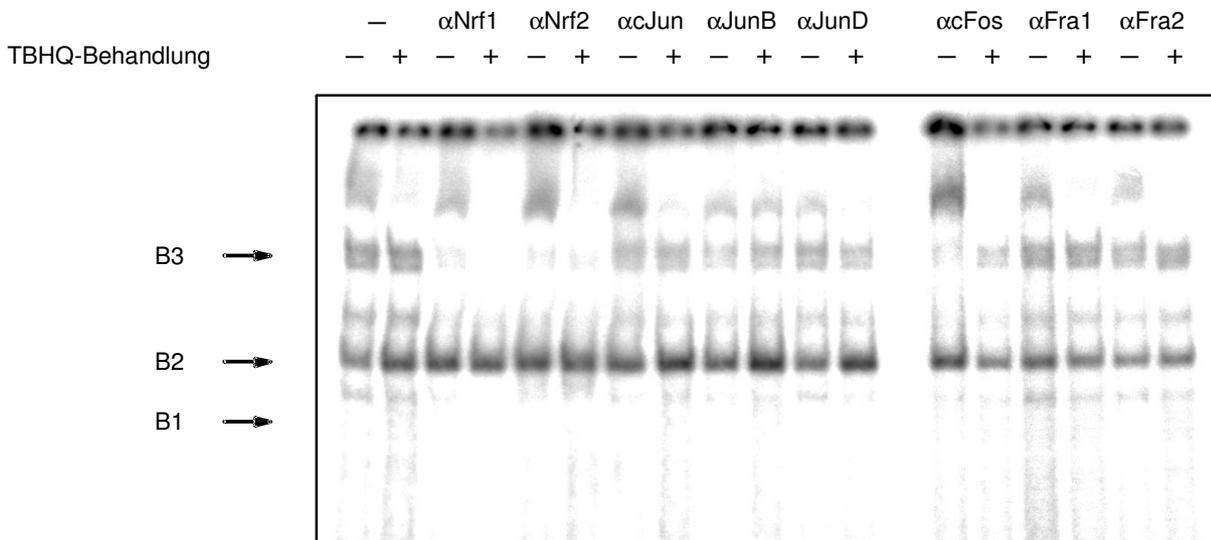
C



### 3.5 Charakterisierung der an das ARE5' bindenden Transkriptionsfaktoren

Bei einer verhältnismäßig niedrigen Elektrophorese-Temperatur von ca. 10°C ( Abb. 30 ) führen von den untersuchten Antikörpern nur die Nrf1 bzw. Nrf2 spezifisch bindenden zum Verschwinden der Banden im Bereich B3. Bei der intensivsten Bande im Bereich B2 läßt sich keine Veränderung erkennen.

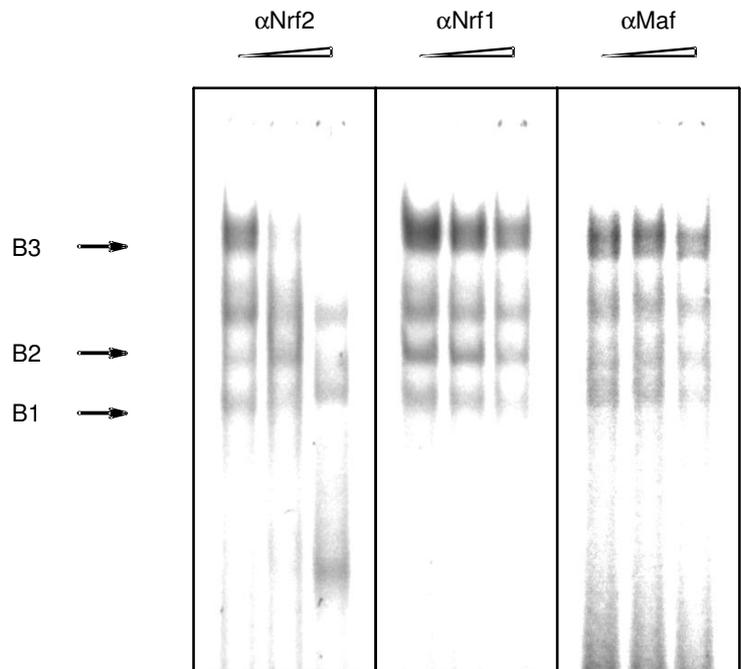
Bei einer Elektrophorese-Temperatur von 15°C ( Abb. 31 ) verschwindet die Spezifität für einzelne Banden beim Antikörper gegen Nrf1. Ebenso wie beim Antikörper gegen Maf läßt sich bei Erhöhung der eingesetzten Antikörpermenge von 1 über 5 auf 10 µg nur noch eine gleichmäßige Verminderung der Bandenintensität erkennen. Dahingegen führt der Nrf2-spezifische Antikörper zunächst ( 5 µg ) zur Verminderung der Banden-Intensitäten im Bereich B3 und schließlich zum völligen Verschwinden der Banden in den Laufweiten-Bereich B2 und zum Erscheinen neuer Banden zwischen den Bereichen B1 und B2 und zwischen B1 und den ungebundenen Oligonukleotid-Sonden.



**Abb. 30** : Einfluß spezifischer Antikörper gegen verschiedene Transkriptionsfaktoren auf die Bindung des ARE5'-Motivs durch nukleäre Proteine der Caco-2/TC7 Zelllinie.

Gelshift-Analyse unter Verwendung von jeweils 5 µg Antikörper, radioaktiv markierter doppelsträngiger 33-merer mit der ARE5'-Sequenz und nukleären Extrakten unbehandelter (-) und 42 h mit 80 µM TBHQ behandelte (+) Caco-2/TC7 Zellkulturen. Die Elektrophorese wurde bei ca. 10°C durchgeführt.

**Abb. 31 :** Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von spezifischen Antikörpern gegen Nrf1, Nrf2 und Maf auf die Bindung des ARE5'-Motivs durch nukleäre Proteine der Caco-2/TC7 Zelllinie. Gelshift-Analyse unter Verwendung von jeweils 1, 5 und 10 µg Antikörper, radioaktiv markierter doppelsträngiger 33-mere mit der ARE5'-Sequenz und nukleären Extrakten 72 h mit 50 µM BNF behandelter Caco-2/TC7 Zellkulturen. Die Elektrophorese wurde bei ca. 15°C durchgeführt.



## 4 Diskussion

Die UDP-Glucuronosyltransferasen ( UGTs ) spielen beim Menschen eine vorherrschende Rolle in der Phase-II des Fremdstoffmetabolismus. Sie werden bekanntermaßen sowohl durch endogene als auch Umweltfaktoren reguliert. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß eine der menschlichen Isoformen der UGT-Familie, die humane UGT1A6, im Caco-2-Modellsystem durch *tert*-Butylhydrochinon ( TBHQ ) induziert werden kann ( Münzel P.A. et al, 1999 ).

TBHQ wurde in Nagern als Prototyp einer Reihe verschiedenartiger, meist aber elektrophiler Substanzen charakterisiert, den sogenannten 'monofunktionalen Induktoren' oder auch 'Induktoren vom Antioxidantien-Typ'. Diese lösen eine eigene, erst kürzlich charakterisierte Signalkette aus. Es wird davon ausgegangen, daß aufgrund dieser Signalkette gegenüber subtoxischen Dosen exponierte Zellen verstärkt protektive Enzyme unter anderem der Phase-II des Fremdstoffmetabolismus exprimieren und damit eine erhöhte Resistenz gegenüber der Toxizität dieser Stoffe erlangen. Es wird weiterhin angenommen, daß die UGT1A6 der Nager und des Menschen ein Teil dieser ARE-gesteuerten Gen-Batterie ist. Unter den in der Ratte untersuchten Phase-II-Enzymen weist die UGT1A6 mit die höchste Induzierbarkeit durch monofunktionale Induktoren auf ( Buetler T.M. et al., 1995 ).

Die Induzierbarkeit der menschlichen UGTs durch monofunktionale Induktoren konnte inzwischen mehrfach bestätigt werden ( Sabolovic N. et al., 2000 ; Galijatovic A. et al, 2000 ). Über den Mechanismus der Induktion der UGTs durch TBHQ ist indessen bisher wenig bekannt. Es sollte deshalb versucht werden, auf der Grundlage des TBHQ-induzierbaren Modellsystems der Caco-2/TC7-Zelle diesen Mechanismus näher zu untersuchen.

### 4.1 Vorversuche zur Antioxidantientyp-Induktion

Zunächst durchgeführte Untersuchungen auf Ebene der Enzymaktivität bestätigten die Eignung des Caco-2/TC7-Zellmodells als Grundlage für mechanistische Studien. Das Caco-2/TC7-Zellmodell weist, im Gegensatz zum ebenfalls untersuchten HepG2-Klon ( vgl. 3.1.1.3 ), eindeutig nachweisbare UDP-Glucuronosyltransferase-Aktivitäten auf ( vgl. 3.1.1.4 ). Die Induzierbarkeit der UGT durch TBHQ in diesem Zellmodell übersteigt noch diejenige der NQO1 in der menschlichen Hepatom-Zelllinie HepG2 ( vgl. 3.1.1.1 ), einem gut charakterisierten System, das bereits des öfteren als Grundlage für mechanistische Studien zur ARE-vermittelten Induktion diente. Wie neuere Untersuchungen zur NQO1 in der Caco-2-Zelllinie nachwiesen, beruht die NQO1-Defizienz auf einem Defekt auf Proteinebene ( Bonnesen C. et al., 2001 ). Es ist also nicht von einer generellen Beeinträchtigung der monofunktionalen Signalkette auszugehen.

TBHQ erweist sich im Vergleich mit anderen monofunktionalen Induktoren ebenfalls als gut geeignet, als Prototyp-Induktor für mechanistische Studien zu dienen. Die Induktions-Wirkung setzt relativ rasch ein ( vgl. 3.1.1.4 ), die erreichbaren Induktionsfaktoren befinden sich im Bereich maximaler Wirksamkeit ( vgl. 3.1.2 ; Prochaska H.J., Santamaria A.B., 1988 ) und die dabei einzusetzenden Konzentrationen wirken in Verbindung mit der Caco-2-Zellkultur noch nicht toxisch ( vgl. 3.1.1.4 ).

Die Induktion der UGT1A6 kann auch auf Ebene der mRNA-Expression beobachtet werden ( vgl. 3.2 ). Die erhaltenen Induktionsfaktoren bewegen sich in der selben Größenordnung wie bei den Enzym-Aktivitäten ( 2 bis 3 ). Es ergeben sich ebenfalls Hinweise auf eine, für

mechanistische Studien günstige, schnell einsetzende Aktivierung der Genexpression ( vgl. 3.2.2 ).

Insgesamt konnte damit die Eignung der Caco-2/TC7-Zelllinie als Modellsystem für die Untersuchung zum Mechanismus der monofunktionalen Induktion der menschlichen UGT1A6 als bestätigt angesehen werden.

## 4.2 Transkriptionelle Regulation der UGT1A6

Aufgrund der Induzierbarkeit der UDP-Glucuronosyltransferasen durch verschiedene monofunktionale Induktoren wird davon ausgegangen, daß diese Enzymfamilie Teil einer Genbatte-rie protektiver Enzyme ist, die bei oxidativem oder elektrophilem Streß transkriptionell akti-viert werden.

Für verschiedene Phase-II-Enzyme, so z.B. die Glutathion-S-transferase A1/2 der Nager ( Rushmore T.H., Pickett C.B., 1990 ; Friling R.S. et al., 1990 ) und der NAD(P)H:Chinon Oxi-doreduktase 1 der Ratte ( Favreau L.V., Pickett C.B., 1991 ) und des Menschen ( Jaiswal A.K., 1991 ) konnte diese Signalkette näher charakterisiert werden. In den regulatorischen Sequenzen der betroffenen Gene befinden sich sogenannte 'Antioxidant Response Ele-ments'. Diese sind dort, in Form einzelner oder allenfalls zweifacher Kopien der Konsensus-Sequenz, verantwortlich für einen maßgeblichen Anteil der basalen Expression und für den überwiegenden Anteil der transkriptionellen Aktivierung durch monofunktionale Induktoren. Die Basenabfolge bindet in spezifischer Art und Weise unter anderem Nrf2, AP-1-Proteine und 'kleine Maf-Proteine', Transkriptions-Faktoren der Leucin-Zipper-Familie ( Venugopal R., Jaiswal A.K., 1996 ; Venugopal R., Jaiswal A.K., 1998 ; Jeyapaul J., Jaiswal A.K., 2000 ; Wild A.C. et al., 1999 ; Nguyen T. et al., 2000 ; Dhakshinamoorthy S., Jaiswal A.K., 2000 ).

Neben solchen "stark transaktivierenden" AREs - mit einer für die Vermittlung starker basaler Expression und sehr deutlicher Induzierbarkeit notwendigen Basenabfolge ( Wasserman W.W., Fahl W.E., 1997a ) - existieren vermutlich auch AREs bzw. ARE-ähnliche Transkripti-ons-Elemente, die einen moderateren Einfluß auf die Transkriptionsrate nehmen. Diese dürf-ten zwar mit den gleichen Transkriptions-Faktoren interagieren, aber durch geringfügige Abweichungen von der für eine optimale Bindung bzw. Transaktivierung erforderlichen Sequenz deren Wirksamkeit modulieren. Die Einbeziehung von Sequenzen, bei denen von einer in diesem Sinne "ARE-ähnlichen" Wirkung ausgegangen wird ( Itoh K. et al., 1997 ) erlaubt eine etwas weniger konservierte Konsensus-Sequenz ( vgl. 3.3.1.1 ), die als Grund-lage für eine Analyse der regulatorischen Sequenzen der menschlichen UGT1A6 herangezo-gen wurde.

### 4.2.1 "Potentielle" ARE-ähnliche Motive der regulatorischen Sequenz der UGT1A6

Das UGT1A6-Strukturgen wird, gemeinsam mit den anderen aufgrund der phylogenetischen Verhältnisse der UGT1-Familie zugeordneten Isoformen, im Rahmen eines ca. 200 kb großen Genlokus auf dem Chromosom 2 codiert ( Gong Q.H. et al., 2001 ; Tukey R.H., Strassburg C.P., 2001 ). Die einzigartige Gen-Organisation der UGT1A-Familie bedingt, daß mehrere Abschnitte - mit jeweils einem eigenständigen Promotor und einem eigenen Exon 1 - mit den gemeinsamen Exons 2 bis 5 zu einem funktionellen UGT-Transkript "verspleißt" und so die in den Exons 1 codierten, unterschiedlichen Substratspezifitäten unabhängig

reguliert werden können ( vgl. 1.2.1 ). Ungefähr 3 kb der 5'-terminalen Region des Promotors der UGT1A6 waren bereits sequenziert worden ( Münzel P.A. et al., 1998 ; Ritter J.K. et al., 1992 ) und standen für Reporter-gen-Analysen zur Verfügung.

Eine Suche nach der ermittelten ARE-Konsensus-Sequenz ergab innerhalb dieses Bereichs vier ARE-ähnliche Elemente, die im weiteren als ARE1', ARE2', ARE3' und ARE5' bezeichnet wurden. Beim ARE4' handelt es sich um ein Motiv, in dem die beiden Elemente der Konsensus-Sequenz, die Basenabfolge 'TGAC' und die sogenannte 'GC-Box', nicht durch drei, sondern nur durch zwei Nukleotide voneinander getrennt sind. Es besitzt eine gewisse AP-1-Ähnlichkeit ( nach 'Transfac'-Datenbank, vgl. Abb. 32, 100% Übereinstimmung bezüglich Kernsequenz und ca. 90% bezüglich flankierender Sequenz ) und befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem als funktional nachgewiesenen 'Xenobiotic Responsive Element' ( XRE ; Münzel P.A. et al., 1996 ).

Interessanterweise konnten zusätzliche ARE-ähnliche Sequenzen ( entsprechend der Konsensus-Sequenz nach Itoh. K. et al., 1997 ) erst in der weiter entfernten Umgebung des UGT1A6 Promotors gefunden werden, -6500 bp in 5'-terminaler Richtung sowie +1800 bp und +5500 bp in 3'-terminaler Richtung.

#### **4.2.2 Transkriptionelle Regulation der UGT1A6 durch den Antioxidantientyp-Induktor TBHQ**

Zur näheren Untersuchung einer über die verfügbare regulatorische Sequenz stattfindenden transkriptionellen Kontrolle sollte diese mit Hilfe des Dual-Luciferase-Reportersystems näher untersucht werden. Dieses System verwendet als Bezug zur Transkriptions-Effizienz einen Vektor, der mit Hilfe eines Thymidinkinase-Promotors die konstitutive Expression des Reportergens Renilla-Luciferase vermittelt - die zu untersuchende regulatorische Sequenz kontrolliert dahingegen auf einem zweiten Konstrukt die Expression der Firefly-Luciferase ( vgl. 2.6, 2.8 ). Es konnte gezeigt werden, daß bei identischer transkriptioneller Kontrolle beider Reportergene durch den Thymidinkinase-Promotor diese ein nicht durch TBHQ beeinflussbares Verhältnis an Enzym-Aktivitäten exprimieren ( vgl. 3.3.2.1 ) - wenn sich jedoch die Firefly-Luciferase unter der Kontrolle der regulatorischen Sequenz der UGT1A6 befindet, sich diese durch TBHQ induzieren läßt. Die Beteiligung transkriptioneller Regulationsmechanismen bei der Induktion der UGT1A6 durch TBHQ war damit nachgewiesen. Der dabei erhaltene Induktionsfaktor belief sich dabei auf etwa 2 und war damit mit dem Induktionsfaktor vergleichbar, der sich bei der Messung der Enzym-Aktivitäten ergab.

#### **4.2.3 Deletions-Analyse der regulatorischen Sequenz der UGT1A6**

Eine weitere Eingrenzung von Bereichen mit funktionellen Transkriptions-Elementen konnte mit Hilfe einer Deletions-Analyse erfolgen ( vgl. 3.3.2.3 ).

Hohe basale Expression wurde schon durch die unmittelbare Umgebung des Promotors vermittelt ( ca. 80% der maximalen basalen Expression, Abb. 26 ). Eine weitere, signifikante Zunahme der basalen Expression war mit dem Bereich der regulatorischen Sequenz der UGT1A6 verbunden, der das in vorangegangenen Untersuchungen bereits als funktionell nachgewiesene 'Xenobiotic Responsive Element' ( Münzel P.A. et al., 1996 ) und das ARE4' enthielt.

Eine sukzessive Abnahme der Induzierbarkeit von 2,08 auf 1,44 war in der Reihe der Transgene UGT1A6Luc-2981, -2330, -1806, -1550 und -1449 zu beobachten. Das ARE-ähnliche Motiv ARE5' war dabei in einem Bereich enthalten, dessen Deletion zu dem signifikantesten

Verlust an Induzierbarkeit führte, das ARE4' in einer Region, deren Verlust mit einer maßgeblichen Abnahme an basaler und induzierter Reporter-gen-Aktivität verbunden war. Auch im Zuge weiterer Deletionen in der Reihe der Transgene UGT1A6Luc-1449 bis UGT1A6Luc-225 nahm die Induzierbarkeit vorwiegend in Regionen ab, die ARE-ähnliche Motive enthielten. Die Abnahme von 1,41 auf 1,32 vom Transgen UGT1A6Luc-765 auf das Transgen UGT1A6Luc-434 könnte auf die Motive ARE3' und ARE2' zurückzuführen sein. Die verbliebene Induzierbarkeit des Konstrukts UGT1A6Luc-225, in das die unmittelbare Umgebung des Promotors der UGT1A6 einkloniert war, könnte vom enthaltenen ARE-ähnlichen Motiv ARE1' hervorgerufen worden sein.

#### 4.2.4 Vermittlung der Induzierbarkeit auf einen 'artificialen Promotor' durch regulatorische Sequenzen der UGT1A6

Ein maßgeblicher Anteil der Induktion durch TBHQ wurde damit von Bereichen der regulatorischen Sequenz der UGT1A6 vermittelt, die die ARE-ähnlichen Motive ARE5' und ARE4' enthielten. Diese beiden Bereiche wurden deshalb jeweils vor einen 'artificialen Promotor' einkloniert und die Auswirkung auf die Expression eines 3'-terminal befindlichen Reporter-gens, der Firefly-Luciferase, untersucht ( vgl. 3.3.2.4 ). Mit beiden Konstrukten konnte eine - wenn auch sehr moderate - Induktion durch TBHQ beobachtet werden, mit Induktionsfaktoren von  $1,11 \pm 0,07$  im Falle des ARE4'-TkLuc-Konstrukts und  $1,15 \pm 0,03$  im Falle des ARE5'-TkLuc-Konstrukts. Die Effekte in Verbindung mit dem ARE5'-Motiv waren statistisch signifikant (  $p < 0,05$  ).

Aufgrund der Eigenschaften der eingesetzten artificialen Promotor-Sequenz muß davon ausgegangen werden, daß auch starke funktionelle Transkriptions-Elemente nur moderate Aktivierungen der Reporter-gen-Aktivität hervorrufen. Im Gegensatz zum 'minimalen Promotor' des Thymidinkinase-Gens des Herpes Simplex Virus ( Länge ca. 80 bp ), der für diesen Zweck in Verbindungen mit Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation durch monofunktionale Induktoren eingesetzt wurde ( Venugopal R., Jaiswal A.K., 1996 ; Mulcahy R.T. et al., 1997 ; Venugopal R., Jaiswal A.K., 1998 ; ), handelt es sich im vorliegenden Fall um die vollständige regulatorische Sequenz des Thymidinkinase-Gens ( ca. 800 bp ). Diese vermittelt eine konstitutive Expression und bewirkt so eine erheblich geringere Sensitivität gegenüber der Anwesenheit von 'Enhancern' und/oder 'Silencern'. Daß trotzdem eine Induktion durch TBHQ nachgewiesen werden konnte, macht eine entsprechende funktionelle Rolle der einklonierten regulatorischen Sequenzen um so wahrscheinlicher.

Insgesamt gesehen ist es denkbar, daß mehrere schwach wirkende ARE-ähnliche Transkriptions-Elemente synergistisch kooperieren, um die UGT1A6-Expression an eine Exposition gegenüber Substanzen anzupassen, die elektrophilen und/oder oxidativen Streß hervorrufen. Das Zusammenwirken sich wiederholender Transkriptionselemente ist bei der Regulation Fremdstoff-metabolisierender Enzyme häufig zu beobachten. So befinden sich z.B. beim Gen der Cytochrom-P450-Isoform 1A1 des Menschen in der regulatorischen Sequenz insgesamt acht XREs ( Kubota M. et al., 1991 ), die funktionell kooperieren ( Kress S. et al., 1998 ).

'Enhancer' und 'Silencer' wirken grundsätzlich im Sinne von Modulen, d.h. die Wirkung mehrerer solcher Einheiten setzt sich aus deren Einzelwirkungen zusammen. Positiv regulierende 'Enhancer' können die negative Kontrolle von 'Silencern' teilweise oder vollständig kompensieren oder gar umkehren ( Gaub M.P. et al., 1987 ). Die kooperative Wirkung von 'Silencern' und induzierbaren 'Enhancern' im regulatorischen Bereich der UGT1A6 zwischen Nukleotid -1550 und -2330 könnte das beobachtete Verhalten in der Deletions-Analyse, gleichbleibende oder gar abnehmende Reporter-gen-Aktivitäten bei gleichzeitig zunehmender

Induzierbarkeit unter Einbeziehung weiterer 5'-terminaler Sequenzen ( vgl. 3.3.2.3 ) erklären. In der regulatorischen Sequenz der UGT1A6 wurde in vorangegangenen Untersuchungen bereits ein möglicher poly(dCdA)-Silencer bei Position -2220 sequenziert ( vgl. Abb. 32 ; Brück M., 1994 ).

## **4.3 Eigenschaften der ARE-ähnlichen Motive der regulatorischen Sequenz der UGT1A6**

### **4.3.1 Sequenz-spezifische Bindung von nukleären Proteinen an die ARE-ähnlichen Motive**

Um die Eigenschaften der gefundenen ARE-ähnlichen Motive mit dem des "stark transaktivierenden" ARE der menschlichen NQO1 ( NQO1-ARE ) zu vergleichen, wurde im folgenden die Bindung nukleärer Proteine an diese Sequenzen mit Hilfe einer Gelshift-Analyse untersucht.

Die ARE-ähnlichen Motive ARE1', ARE2', ARE3' und ARE5' der UGT1A6 führten, übereinstimmend mit dem NQO1-ARE-Oligonukleotid, zu einer vorherrschenden Bindung bei der Laufweite B2 ( vgl. 3.4.1, Abb. 27 ). Eine weitergehende Übereinstimmung mit der als Referenz eingesetzten NQO1-ARE-Sonde weist das Motiv ARE5' auf. Mit beiden Oligonukleotiden lassen sich höhermolekulare Komplexe bei der Laufweite B3 nachweisen, wobei es sich ebenfalls in beiden Fällen um mindestens zwei verschiedenartige Bindungen mit geringfügig unterschiedlichen Mobilitäten handeln dürfte. Das ARE4'-Oligonukleotid führt zu der stärksten beobachtbaren Bindung, allerdings in einem - relativ niedermolekularen Komplexen entsprechenden - Laufweiten-Bereich ( B1 ), in dem sich mit den anderen Sonden keine Bindungen nachweisen ließen.

Die Komplexe der markierten Oligonukleotid-Sonden mit nukleären Proteinen bildeten sich in Anwesenheit des standardmäßig im Überschuß zugesetzten poly(dIdC)-Oligonukleotids. Die Sonden konnten aber durch einen Überschuß an unmarkiertem Oligonukleotid mit der Basenabfolge der jeweiligen Sonde verdrängt werden ( Abb. 27, '+' ), womit eine Sequenz-spezifische Bindung nachgewiesen war.

Eine nähere Untersuchung der Kompetition mit unmarkierten Oligonukleotiden in Verbindung mit den Motiven NQO1-ARE und ARE5' ( vgl. 3.4.1, Abb. 28 ) zeigte, daß auch ein zusätzlich zum poly(dIdC)-Oligonukleotid zugegebenes 33-mer die Bindung nukleärer Proteine nicht beeinträchtigen konnte. Die Beobachtung, daß die unmarkierte Sequenz des ARE5' nur partiell imstande war, die NQO1-ARE-Sonde aus ihren Komplexen ( bei Laufweite B2 ) zu verdrängen, steht in Übereinstimmung mit der Auffassung, daß es sich bei den in der regulatorischen Sequenz der UGT1A6 gefundenen ARE-ähnlichen Motiven um Transkriptions-Elemente handelt, die durch eine teilweise Abweichung von der - für eine Bindung spezifischer Transkriptions-Faktoren optimalen - Basenabfolge ein moderateres Transaktivierungspotential besitzen.

Der Umstand, daß die in der Gelshift-Analyse mit den ARE-ähnlichen Motiven ARE1', ARE2', ARE3' und insbesondere ARE5' zu beobachtenden, Sequenz-spezifischen Bandenmuster eine deutliche Übereinstimmung mit dem der NQO1-Oligonukleotidsonde erkennen lassen, deutet wiederum darauf hin, daß diese Motive mit denselben spezifischen Transkriptions-Faktoren interagieren.

Es besteht im übrigen eine gewisse Ähnlichkeit der hier im Caco-2/TC7 erhaltenen Muster mit denjenigen, die in Verbindung mit verschiedensten ARE-Sequenzen in HepG2-Zellkulturen erhalten wurden ( Wasserman W., Fahl W.E., 1997b ).

### **4.3.2 Wirkung des TBHQ auf die Bindung von nukleären Proteinen an die ARE-ähnlichen Motive**

Im weiteren wurde die Bindung an die ARE-ähnlichen Motive der UGT1A6 und das ARE der menschlichen NQO1 mit nukleären Extrakten TBHQ-behandelter und unbehandelter Caco-2/TC7-Zellkulturen untersucht. Die Sequenzen des ARE1', ARE2', ARE3' und ARE5' wiesen, wieder in Übereinstimmung mit der NQO1-ARE-Oligonukleotidsonde, eine leicht erhöhte Bindung ( bei der Laufweite B2 ) mit nukleären Extrakten behandelter Zellen auf, wobei eine maximale Induktion an Bindungsintensität beim ARE5' zu beobachten war ( Faktor 1,8, Abb. 29 ). Die Bindung nukleärer Proteine an das ARE4' wurde dahingegen von der Behandlung mit TBHQ kaum beeinflusst.

Es wird angenommen, daß an der ARE-vermittelten Regulation der Genexpression der Transkriptions-Faktor Nrf2 eine zentrale Rolle bei der Weiterleitung der Signale monofunktionaler Induktoren einnimmt. So waren die mRNA-Spiegel nahezu aller untersuchten GST-Isoformen und der NQO1 bei Nrf2-(-/-)-'knockout'-Mäusen im Gegensatz zu heterozygoten Tieren deutlich weniger induzierbar ( Itoh K. et al., 1997 ). Es konnte außerdem nachgewiesen werden, daß ein an der Signal-Weiterleitung beteiligter Mechanismus darin besteht, daß der über den Bindungspartner Keap1 mit dem Cytoskelett assoziierte Transkriptions-Faktor Nrf2 freigesetzt wird und daraufhin in den Nukleus transloziert ( Itoh K. et al., 1999 ). In Übereinstimmung mit diesen Befunden könnte die in der Gelshift-Analyse nachgewiesene verstärkte Bindung nukleärer Proteine an die Oligonukleotid-Sonden nach einer Behandlung mit TBHQ Folge einer erhöhten Verfügbarkeit des Transkriptions-Faktors Nrf2 im nukleären Kompartiment sein.

Die verstärkte Bindung nukleärer Proteine an die Oligonukleotid-Sonden könnte auch durch eine veränderte Bindungsaffinität der entsprechenden Transkriptions-Faktoren hervorgerufen werden.

## **4.4 Charakterisierung der an das ARE5'-Motiv bindenden Transkriptionsfaktoren**

Insgesamt ergaben sich insbesondere für das ARE5'-Motiv der regulatorischen Sequenz der UGT1A6 eine Reihe von Hinweisen, daß es sich dabei um ein funktionelles ARE-ähnliches Transkriptions-Element handelt : 1.) Die Deletion des Bereichs der regulatorischen Sequenz, der das ARE5' enthielt, ist mit einem deutlichen Verlust an Induzierbarkeit verbunden ( Abb. 25C, Induktionsfaktor 1,85 bei UGT1A6-2330, 1,56 bei -1806 ). 2.) Dieser regulatorische Bereich der UGT1A6 vermittelte einem artifiziellen Promotor ( dem Thymidinkinase-Promotor ), der aufgrund seiner Eigenschaften nur mäßig sensitiv auf die Anwesenheit von regulatorischen Elementen reagiert, eine statistisch signifikante TBHQ-Induzierbarkeit ( Abb. 26 ). 3.) Die Menge und Mobilität der Komplexe, die sich aus der Bindung von nukleären Proteinen an das NQO1-ARE und das ARE5' ergaben, entsprachen sich weitgehend ( Abb. 27 ). 4.) Die Mengen-Verhältnisse dieser Komplexe reagieren in gleicher Art und Weise auf eine Behandlung mit TBHQ ( Abb. 29 ).

Aus diesem Grunde sollten die an das ARE5'-Motiv bindenden nukleären Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen Transkriptions-Faktoren näher charakterisiert werden.

Untersuchungen zum Mechanismus der transkriptionellen Aktivierung der GSTA1/2 der Nager und der NQO1 der Ratte und des Menschen durch monofunktionale Induktoren wiesen verschiedene Transkriptions-Faktoren der Leucin-Zipper-Protein-Familie als Bindungspartner der ARE-Sequenzen aus ( vgl. 1.4.3 ; Venugopal R., Jaiswal A.K., 1996 ; Venugopal R., Jaiswal A.K., 1998 ). Nukleäre Extrakte TBHQ-behandelter und unbehandelter Caco-2/TC7-Zellkulturen wurden deshalb mit verschiedenen Antikörpern gegen solche Proteine ( Nrf1, Nrf2, cJun, JunB, JunD, cFos, Fra1, Fra2, Maf ) vorbehandelt und einer Gelshift-Analyse unterzogen.

Bei einer verhältnismäßig niedrigen Elektrophorese-Temperatur von 10°C wurde die Bildung der höhermolekularen Komplexe bei Laufweite B3 durch Antikörper gegen Nrf1 und Nrf2 verhindert, nicht aber durch Antikörper gegen cJun, JunB, JunD, cFos, Fra1 und Fra2 ( vgl. 3.5, Abb. 30 ). Eine nähere Untersuchung wies eine Dosis-abhängige Konkurrenz zwischen Nrf2-Antikörper und der ARE5'-Gelshift-Sonde um nukleäre Proteine nach, die mit zunehmender Antikörper-Konzentration zunächst selektiv Komplexe bei der Laufweite B3 und schließlich auch Bindungen im Laufweiten-Bereich B2 verhinderte ( vgl. 3.5, Abb. 31 ). Antikörper gegen Nrf1 und Maf ließen dagegen nur eine gleichmäßig geringer werdende Intensität der Banden erkennen, ohne daß sich dabei die Intensitäts-Verhältnisse änderten. Zusätzlich erscheinen in Verbindung mit hohen Konzentrationen an Nrf2-Antikörper zwei neue Komplexe, einer zwischen den Laufweiten B2 und B1 und ein zweiter bei deutlich größerer Laufweite als B1. Eine gleichmäßige bei allen Banden stattfindende Abnahme der Intensität könnte Folge einer unspezifischen Wechselwirkung durch hohe Antikörper-Konzentrationen sein. Im Falle der zu beobachtenden selektiven Verdrängung der Gelshift-Sonde von bestimmten Komplexen in Verbindung mit dem Nrf2-Antikörper muß es sich dahingegen um spezifische Wechselwirkungen handeln.

Nrf1 scheint diesen Ergebnissen zufolge eher nicht an den spezifischen Bindungen des ARE5'-Motivs mit nukleären Proteinen beteiligt zu sein. Daß bei relativ niedrigen Elektrophorese-Temperaturen Wechselwirkungen mit dem Nrf1-Antikörper zu beobachten waren, könnte Folge einer geringeren Selektivität des Antikörpers bei diesen Bedingungen sein. Die Befunde der Dosis-abhängigen, selektiven Konkurrenz mit dem Nrf2-Antikörper sprechen jedoch dafür, daß dieser Transkriptionsfaktor an diesen Komplexen beteiligt ist. Das Auftreten zusätzlicher Banden könnte man - in Übereinstimmung dazu - damit erklären, daß aufgrund einer weitgehenden Maskierung des Transkriptions-Faktors Nrf2 durch hohe Antikörper-Konzentrationen Bindungsstellen am ARE5'-Motiv der Gelshift-Sonde frei würden. Diese Bindungsstellen könnten neue Komplexe binden, nun auch solche mit deutlich geringerer Affinität zur Sequenz des ARE5'-Motivs. Eventuell könnten die zusätzlichen Banden auch durch "Rumpfkomplexe" hervorgerufen worden sein, denen zwar der Transkriptions-Faktor Nrf2 fehlt, die aber immer noch zu einer Sequenz-spezifischen Bindung von DNA-Molekülen fähig sind.

## 4.5 Bedeutung der Ergebnisse

Die Ähnlichkeit der Sequenzen und die Eigenschaften der untersuchten AREs weisen darauf hin, daß die Induktion der menschlichen UGT1A6 durch TBHQ ( unter anderem ) über einen "ARE-ähnlichen" Mechanismus abläuft. Eine Einteilung ARE-gesteuerter Gene in verschie-

dene Klassen - abhängig vom Grad der Induzierbarkeit - wurde bereits vorgeschlagen und mit dem Maß der Übereinstimmung zu einer Konsensus-Sequenz in Verbindung gebracht ( Wasserman W., Fahl W.E., 1998a ). In diesem Sinne könnte die menschliche UGT1A6 - mit ihrer signifikanten, wenn auch nur moderaten Induzierbarkeit durch TBHQ - in eine untere Induktions-Klasse gehören.

Auch die Induzierbarkeit der menschlichen UGT1A6-Genexpression durch Ah-Rezeptor-Liganden ist im Caco-2/TC7 Zellmodell nur moderat ( Münzel P.A. et al., 1998 ). Insgesamt scheint bei der UGT1A6 eine "inverse" Beziehung zwischen konstitutiver und induzierbarer Expression vorzuliegen. So kann z.B. im Lebergewebe der Ratte eine niedrige basale Expression der UGT1A6 deutlich durch TCDD, einen Prototyp der Ah-Rezeptorliganden, induziert, im Hodengewebe dahingegen eine hohe konstitutive Expression durch eine TCDD-Behandlung nicht weiter erhöht werden ( Münzel P.A. et al., 1994 ; Münzel P.A. et al., 1996 ). Die basale Expression der menschlichen UGT1A6 in der Caco-2/TC7-Zelllinie ist bereits relativ hoch, die moderate Induzierbarkeit durch TBHQ stünde also in Übereinstimmung mit diesem Modell.

Auch wenn die Induzierbarkeit der menschlichen UGT1A6 durch TBHQ nur moderat ausfällt, besteht Grund zur Annahme, daß dies in Verbindung mit den GSTs und der NQO1 zur Verminderung der Toxizität von chinoiden Substanzen beiträgt. Chinoide Verbindungen können als Katalysator für toxische Redoxzyklen wirken. Die Glucuronidierung dieser Substanzen beseitigt deren katalytische Eigenschaft - im Gegensatz zur 2-Elektronen-Reduktion durch die Chinonreduktase und der Glutathionylierung durch Glutathion-S-Transferasen - effizient und dauerhaft. Die Annahme eines protektiven Effekts der Nrf2-abhängigen Induktion Fremdstoff-metabolisierender Enzyme unterstützend, sind Nrf2(-/-)-'knockout'-Mäuse, die eine beeinträchtigte Induzierbarkeit unter anderem auch der UGT1A6 aufweisen ( Ramos-Gomez M. et al., 2001 ), insbesondere gegenüber den toxischen Wirkungen von Paracetamol empfindlich ( Enomoto A. et al., 2001 ). Dessen toxische Wirkung entsteht durch einen chinoiden Metaboliten des Paracetamols, der zu oxidativem Streß führt.

Auf eine Induzierbarkeit der menschlichen UGTs auch in vivo hinweisend, konnte eine signifikant erhöhte Ausscheidung von Paracetamol-Glucuronid bei Personen nachgewiesen werden, die viel Kohlgemüse und Rosenkohl zu sich genommen hatten ( Pantuck E.J. et al., 1984 ) - Gemüse-Sorten, die zum Teil beträchtliche Mengen an monofunktionalen Induktoren enthalten. Die UGT1A6 ist an der Konjugation von Paracetamol beteiligt ( Bock K.W. et al., 1993 ).

Außerdem stehen Phase-II-Enzyme des Fremdstoffmetabolismus im allgemeinen und die UGTs im besonderen häufig in direkter Konkurrenz zu giftenden Reaktionen, z.B. solchen, die Präkanzerogene in Kanzerogene metabolisieren ( Bock K.W., 1991 ). Insofern können auch nur moderate Induktionen z.B. der UGT-Aktivität zu einer wesentlich geringeren toxischen Wirksamkeit von Präkanzerogenen führen.

Sich der beschriebenen Induktions-Mechanismen bedienende Vorsorgemaßnahmen gegen Krebs, Chemoprävention genannt, ziehen in jüngster Zeit großes Interesse auf sich ( Stoner G.D. et al., 1997 ; Kensler T.W., 1997 ). Es gibt Anzeichen dafür, daß insbesondere in bestimmten Nahrungsmitteln ( z.B. Cruciferen ) enthaltene monofunktionale Induktoren helfen können, die Entstehung von Colon-Krebs zu vermeiden.

Weitere Arbeiten sind notwendig, um den vorgeschlagenen, ARE-vermittelten Mechanismus der Induktion der UGT1A6 durch TBHQ zu beweisen. Reporter-Gen-Analysen der isolierten, ARE-ähnlichen Motive in Verbindung mit dem minimalen Promotor der Thymidinkinase ( vgl. Venugopal R., Jaiswal A.K., 1996 ; Venugopal R., Jaiswal A.K. 1998 ) würden einen sensitiven Nachweis der Funktionalität der Transkriptions-Elemente ermöglichen. 'Orts-gerichtete'

Mutagenesen könnten in einem weiteren Schritt das Ausmaß der Beteiligung einzelner Motive an der Gesamtwirkung der regulatorischen Sequenz der UGT1A6 klären.

Das Caco-2-Zellmodell dürfte ein geeignetes Modell sein, um den postulierten Mechanismus weiter zu untersuchen.

## 4.6 Zusammenfassung

Die UDP-Glucuronosyltransferasen ( UGT ) sind wichtige Enzyme der Phase-II des Fremdstoffmetabolismus. Sie werden sowohl von genetischen als auch von Umweltfaktoren reguliert. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß eine UGT-Isoform, die UGT1A6 des Menschen, in Caco-2-Zellen durch 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin ( TCDD ) über den 'Aryl hydrocarbon'-Rezeptor ( Ah-Rezeptor ) und durch *tert*-Butylhydrochinon ( TBHQ ) induziert werden kann. TBHQ wurde in Nagern als Prototyp eines neuen Induktions-Mechanismus charakterisiert, der durch eine Vielzahl von elektrophilen und prooxidativen Stoffen, den sogenannten 'monofunktionalen Induktoren' oder auch 'Induktoren vom Antioxidantien-Typ', ausgelöst wird. Es wird davon ausgegangen, daß in subtoxischen Dosen exponierte Zellen protektive Enzyme induzieren, wodurch sie gegen die Toxizität dieser Stoffe resistent werden. Bei zwei monofunktional induzierbaren Phase-II-Enzymen, der NAD(P)H:Chinon Oxidoreduktase ( NQO1 ) und der Glutathion-S-Transferase A1/2 ( GST A1/2 ), wurde nachgewiesen, daß die transkriptionelle Aktivierung der Gene über 'Antioxidant Response Elements' ( ARE ) im regulatorischen Bereich dieser Gene erfolgt. Durch Experimente mit 'knockout'-Mäusen wurde außerdem gezeigt, daß bei der Aktivierung des ARE der Leucin-Zipper-Transkriptions-Faktor Nrf2 beteiligt ist und daß die UGT1A6 bei diesen Tieren nicht mehr induziert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher am Beispiel der menschlichen UGT1A6 untersucht werden, inwieweit UGT-Isoformen durch monofunktionale Induktoren über einen ähnlichen ARE-Mechanismus induziert werden. Es wurden folgende Ergebnisse erzielt :

- 1.) Durch Transfektions-Studien mit Reporter-Gen-Konstrukten wurde gezeigt, daß 2 von mehreren ARE-ähnlichen Domänen ( ARE' ) in der regulatorischen 5'-Region, die ARE4' und ARE5' genannt wurden, im Bereich der höchsten Induktion durch TBHQ liegen.
- 2.) Gel-Retardations-Analysen mit Oligomeren der beiden ARE-ähnlichen Elemente ARE4' und ARE5' zeigten selektive Bindungen mit nukleären Proteinen, wobei die konstitutiv vorliegende Bindung nach TBHQ-Behandlung der Caco-2-Zellen moderat verstärkt wurde.
- 3.) Vorinkubation der Kernproteine mit Antikörpern gegen das 'Leucin-Zipper-Protein' Nrf2 verringerte die Bindung der Komplexe an das ARE5'-Oligomer.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, daß a) die Induktion der menschlichen UGT1A6 durch monofunktionale Induktoren über einen ARE-ähnlichen Mechanismus verläuft und daß b) die eingesetzte Caco-2/TC7 Zelllinie ein geeignetes Modellsystem darstellt, um den diesem Induktortyp zugrundeliegenden Mechanismus weiter aufzuklären.





## B

Faktor							
Super-Klasse	Klasse	Familie	Sub-familie	Name	Beschreibung	Element	
basische Domäne ( basische DNA-bindende Domäne )	bZip : basische Domäne gefolgt von Leucin-Zipper ( wiederholte Leucin-Reste auf einer Seite einer alpha-Helix vermitteln für DNA-Bindung notwendige Dimerisierung )	AP-1(-like )	NF-E2	Nrf2, ECH, Cnc ( Cap'nCollar )	siehe Einleitung	NFE2	
				NF-E2			NRF1
				Nrf1			
			Maf	v-Maf, c-Maf, MafB, MafK, MafG		AP1	
			Fos	v-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2			
			Jun	c-Jun ( v-Jun, JunB, JunD )		CREBP1 -CJUN	
			CRE-BP/ATF	CRE-BP		nicht cAMP-abhängig ; aktiviert durch verschiedene Streß-Faktoren	CREBP
	CREB	CREB	CREB	cAMP-resonsive binding protein ; im Darm expr., Leber schwach	CREB		
	C/EBP-like	C/EBPβ	C/EBPβ	Akutphasen-Regulation	CEBPB		
	bHLH : basische Domäne gefolgt von Helix-LoopHelix-Motiv ( zwei durch eine Schleife verbundene, potentiell amphipathische alpha-Helices vermitteln für DNA-Bindung notwendige Dimerisierung )	bHLH+PAS	AhR	AhR	Fremdstoff-abhängige Regulation	AHR-ARNT	
				Arnt		ARNT	
		bHLH-'only'	Olf	Olf	spezifisch für olfaktorische Neuronen	OLF	
bHLH-Zip : nacheinander basische Domäne, HLH-Motiv, Leucin-Zipper	ubiquitäre bHLH-Zip	SREBP	SREBP1	Sterol-abhängige Regulation	SREBP1		
			AP-4	AP-4	interagiert mit AP-1, NF-1	AP-4	
NF-1			NF-1	aktivierende Interaktion mit TATA, AP-1, AP-4 ; event. Leber-spezifisch	NF-1		
AP-2			AP-2	Gewebe-spezifische Regulation der menschlichen NQO1	AP-2		
Zink-koodinierte DNA-Bindungs-Domäne	Cys4-Zinkfinger ( pro Rezeptor 2 Zinkfinger : je 4 durch Zink koordinierte Cyteine, zwei alpha-Helices zwischen je 2 Cysteinen, eine vermittelt DNA-Bindung, andere Dimerisierung )	Steroid-Hormon-Rezeptoren	Östrogen-Rezeptoren	ER	hormonelle Regulation	ER	
	Cys2His2-Zinkfinger ( Zinkfinger aus 2 Cysteinen und 2 Histidinen ; Struktur aus einer alpha-Helix einerseits, 2 antiparallelen beta-Strängen andererseits )	Ubiquitäre Cys2His2-Zinkfinger	Sp1	Sp1	in Interaktion mit Enhancern zusätzlich aktivierend. Ubiquitär	SP1	
Helix-Turn-Helix	Homöo-Domäne	nur Homöo-Domäne	HNF-1	HNF-1	Aktivator in einigen Darm-spezifischen Promotoren	HNF-1	
		POU-Domäne		Oct	in der UGT2B7 Promotor-Funktion	OCT	
beta scaffold Factors with minor groove contacts	Rel-Homolgy-Region ( DNA-Bindung durch Loops zweier beta-Faß-Strukturen )	Rel/ancyrin		NFκB	Aktivität u.a. reguliert durch reaktive Sauerstoffspezies	NFκB	
	MADS-Box ( DNA-Bindung durch 'Coiled-Coil-Struktur' zweier alpha-Helices )	Responders to external signals		SRF	induziert für Bildung des Präinitiations-Komplexes optimale Konformation. Oxidative-Streß-Signale vermittelnder Enhancer des c-Jun-Gens	SRF	
	HMG ( High mobility group-like proteins ; 'L'-förmige Gestalt aus drei alpha-Helices, knickt DNA um mehr als 90° )	SOX		SRY	geschlechts-spezifische Transkriptions-Kontrolle ; im Hoden stark exprimiert	SRY	
n.a.					Phenobarbital-Indukt.	BARBIE	
					poly(dCdA)-Silencer	PDCDA	

## 6 Literaturverzeichnis

**Andrews N.C., Kotkow K.J., Ney P.A., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Orkin S.H.; 1993**

The ubiquitous subunit of erythroid transcription factor NF-E2 is a small basic-leucine zipper protein related to the v-maf oncogene.

*Proc Natl Acad Sci USA ; 90(24):11488-92*

**Angel P., Karin M.; 1991**

The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation.

*Biochim Biophys Acta ; 1072(2-3):129-57*

**Berenblum I.; 1929**

*J Pathol Bacteriol ; 32:425-34*

**Bergelson S., Pinkus R., Daniel V.; 1994**

Intracellular glutathione levels regulate Fos/Jun induction and activation of glutathione S-transferase gene expression.

*Cancer Res ; 54(1):36-40*

**Bock K.W., White I.N.; 1974**

UDP-glucuronyltransferase in perfused rat liver and in microsomes: influence of phenobarbital and 3-methylcholanthrene.

*Eur J Biochem ; 46(3):451-9*

**Bock K.W., Kahl R., Lilienblum W.; 1980**

Induction of rat hepatic UDP-glucuronosyltransferases by dietary ethoxyquin.

*Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol ; 310(3):249-52*

**Bock K.W., Bock-Hennig B.S.; 1987**

Differential induction of human liver UDP-glucuronosyltransferase activities by phenobarbital-type inducers.

*Biochem Pharmacol ; 36(23):4137-43*

**Bock K.W., Wiltfang J., Blume R., Ullrich D., Bircher J.; 1987**

Paracetamol as a test drug to determine glucuronide formation in man. Effects of inducers and of smoking.

*Eur J Clin Pharmacol ; 31(6):677-83*

**Bock K.W.; 1991**

Roles of UDP-glucuronosyltransferases in chemical carcinogenesis.

*Crit Rev Biochem Mol Biol ; 26(2):129-50*

**Bock K.W., Forster A., Gscheidmeier H., Bruck M., Munzel P., Schareck W., Fournel-Gigleux S., Burchell B.; 1993**

Paracetamol glucuronidation by recombinant rat and human phenol UDP-glucuronosyltransferases.

*Biochem Pharmacol ; 45(9):1809-14*

**Bonnesen C., Eggleston I.M., Hayes J.D.; 2001**

Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines.

*Cancer Res ; 61(16):6120-30*

**Bradford M.M.; 1976**

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

*Anal Biochem ; 72:248-54*

**Brück M.; 1994**

Regulation der Expression der Phenol-UDP-Glucuronosyl-transferasen (UGT1.6) bei Mensch und Ratte.

*Dissertation ( Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen )*

**Buetler T.M., Gallagher E.P., Wang C., Stahl D.L., Hayes J.D., Eaton D.L.; 1995**

Induction of phase I and phase II drug-metabolizing enzyme mRNA, protein, and activity by BHA, ethoxyquin, and oltipraz.

*Toxicol Appl Pharmacol ; 135(1):45-57*

**Bullock W.O., Fernandez J.M., Short J.M.; 1987**

XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming recA Echerichia coli strain with beta galactosidase selection.  
*Biotechniques* ; 5(4):376-9

**Burchell B., Nebert D.W., Nelson D.R., Bock K.W., Iyanagi T., Jansen P.L., Lancet D., Mulder G.J., Chowdhury J.R., Siest G. et al.; 1991**

The UDP glucuronosyltransferase gene superfamily: suggested nomenclature based on evolutionary divergence.  
*DNA Cell Biol* ; 10(7):487-94

**Caro I., Boulenc X., Rousset M., Meunier V., Bourrie M., Julian B., Joyeux H., Roques C., Berger Y., Zweibaum A., Fabre G.; 1995**

Characterization of a newly isolated Caco-2 clone ( TC-7 ) as a model of transport processes and biotransformation of drugs.  
*Int J Pharm* ; 116:147-158

**Carriere V., Barbat A., Rousset M., Brot-Laroche E., Dussaulx E., Cambier D., De Waziers I.D., Beaune P., Zweibaum A.; 1996**

Regulation of sucrase-isomaltase and hexose transporters in Caco-2 cells: a role for cytochrome P-4501A1?  
*Am J Physiol* ; 270(6 Pt 1):G976-86

**Casey J., Davidson N.; 1977**

Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide.  
*Nucleic Acids Res* ; 4(5):1539-52

**Chan K., Kan Y.W.; 1999**

Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice.  
*Proc Natl Acad Sci USA* ; 96(22):12731-6

**Chantret I., Rodolosse A., Barbat A., Dussaulx E., Brot-Laroche E., Zweibaum A., Rousset M.; 1994**

Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation.  
*J Cell Sci* ; 107 ( Pt 1):213-25

**Chelly J., Montarras D., Pinset C., Berwald-Netter Y., Kaplan J.C., Kahn A.; 1990**

Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction. Application to dystrophin mRNA in cultured myogenic and brain cells.  
*Eur J Biochem* ; 187(3):691-8

**Chomczynski P., Sacchi N.; 1987**

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.  
*Anal Biochem* ; 162(1):156-9

**Clewell H.J.3rd., Andersen M.E., Wills R.J., Latriano L.; 1997**

A physiologically based pharmacokinetic model for retinoic acid and its metabolites.  
*J Am Acad Dermatol* ; 36(3 Pt 2):S77-85

**Dalton T.P., Shertzer H.G., Puga A.; 1999**

Regulation of gene expression by reactive oxygen.  
*Annu Rev Pharmacol Toxicol* ; 39:67-101

**Dhakshinamoorthy S., Jaiswal A.K.; 2000**

Small maf (MafG and MafK) proteins negatively regulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase1 gene.  
*J Biol Chem* ; 275(51):40134-41

**Dignam J.D., Lebovitz R.M., Roeder R.G.; 1983**

Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei.  
*Nucleic Acids Res* ; 11(5):1475-89

**Elbirt K.K., Bonkovsky H.L.; 1999**

Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role.  
*Proc Assoc Am Physicians* ; 111(5):438-47

**Emi Y., Ikushiro S., Iyanagi T.; 1995**

Drug-responsive and tissue-specific alternative expression of multiple first exons in rat UDP-glucuronosyltransferase family 1 (UGT1) gene complex.

*J Biochem (Tokyo)* ; 117(2):392-9

**Enomoto A., Itoh K., Nagayoshi E., Haruta J., Kimura T., O'Connor T., Harada T., Yamamoto M.; 2001**

High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes.

*Toxicol Sci* ; 59(1):169-77

**Farr A., Roman A.; 1992**

A pitfall of using a second plasmid to determine transfection efficiency.

*Nucleic Acids Res* ; 20(4):920

**Favreau L.V., Pickett C.B.; 1991**

Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H:quinone reductase gene. Identification of regulatory elements controlling basal level expression and inducible expression by planar aromatic compounds and phenolic antioxidants.

*J Biol Chem* ; 266(7):4556-61

**Favreau L.V., Pickett C.B.; 1993**

Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H:quinone reductase gene. Characterization of a DNA-protein interaction at the antioxidant responsive element and induction by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate.

*J Biol Chem* ; 268(26):19875-81

**Favreau L.V., Pickett C.B.; 1995**

The rat quinone reductase antioxidant response element. Identification of the nucleotide sequence required for basal and inducible activity and detection of antioxidant response element-binding proteins in hepatoma and non-hepatoma cell lines.

*J Biol Chem* ; 270(41):24468-74

**Fogh J., Wright W.C., Loveless J.D.; 1977a**

Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors.

*J Natl Cancer Inst* ; 58(2):209-14

**Fogh J., Fogh J.M., Orfeo T.; 1977b**

One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice.

*J Natl Cancer Inst* ; 59(1):221-6

**Friling R.S., Bensimon A., Tichauer Y., Daniel V.; 1990**

Xenobiotic-inducible expression of murine glutathione S-transferase Ya subunit gene is controlled by an electrophile-responsive element.

*Proc Natl Acad Sci USA* ; 87(16):6258-62

**Friling R.S., Bergelson S., Daniel V.; 1992**

Two adjacent AP-1-like binding sites form the electrophile-responsive element of the murine glutathione S-transferase Ya subunit gene.

*Proc Natl Acad Sci USA* ; 89(2):668-72

**Galijatovic A., Walle U.K., Walle T.; 2000**

Induction of UDP-glucuronosyltransferase by the flavonoids chrysin and quercetin in Caco-2 cells.

*Pharm Res* ; 17(1):21-6

**Galloway D.C., Blake D.G., Shepherd A.G., McLellan L.I.; 1997**

Regulation of human gamma-glutamylcysteine synthetase: co-ordinate induction of the catalytic and regulatory subunits in HepG2 cells.

*Biochem J* ; 328 ( Pt 1):99-104

**Galloway D.C., McLellan L.I.; 1998**

Inducible expression of the gamma-glutamylcysteine synthetase light subunit by t-butylhydroquinone in HepG2 cells is not dependent on an antioxidant-responsive element.

*Biochem J* ; 336 ( Pt 3):535-9

**Galter D., Mihm S., Droge W.; 1994**

Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factor kappa B and the activator protein-1.

*Eur J Biochem* ; 221(2):639-48

**Gaub M.P., Dierich A., Astinotti D., Touitou I., Chambon P.; 1987**

The chicken ovalbumin promoter is under negative control which is relieved by steroid hormones.  
*EMBO J* ; 6(8):2313-20

**Gong Q.H., Cho J.W., Huang T., Potter C., Gholami N., Basu N.K., Kubota S., Carvalho S., Pennington M.W., Owens I.S., Popescu N.C.; 2001**

Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus.  
*Pharmacogenetics* ; 11(4):357-68

**Gottesman M.M., Pastan I.; 1993**

Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter.  
*Annu Rev Biochem* ; 62:385-427

**Gottesman M.M., Pastan I., Ambudkar S.V.; 1996**

P-glycoprotein and multidrug resistance.  
*Curr Opin Genet Dev* ; 6(5):610-7

**Grantham P.H., Weisburger J.H., Weisburger E.K.; 1973**

Effect of the antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) on the metabolism of the carcinogens N-2-fluorenylacetamide and N-hydroxy-N-2-fluorenylacetamide.  
*Food Cosmet Toxicol* ; 11(2):209-17

**Gschaidmeier H., Bock K.W.; 1994**

Radiation inactivation analysis of microsomal UDP-glucuronosyltransferases catalysing mono- and diglucuronide formation of 3,6-dihydroxybenzo(a)pyrene and 3,6-dihydroxychrysene.  
*Biochem Pharmacol* ; 48(8):1545-9

**Guiffre A., Atkinson K., Kearney P.; 1993**

A quantitative polymerase chain reaction assay for interleukin 5 messenger RNA.  
*Anal Biochem* ; 212(1):50-7

**Hallinam T.; 1983**

*VCH-Verlag-Ges, Weinheim* ; ed Bergmeyer HU : 'Methods in Enzymatic Analysis', VolIII, p365-74

**Hanahan D.; 1985**

Techniques for transformation of E.coli.  
*IRL Press, Oxford* ; ed Glover DM : 'DNA cloning: a practical approach', 2

**Hayes J.D., Pulford D.J.; 1995**

The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance.  
*Crit Rev Biochem Mol Biol* ; 30(6):445-600

**Heinonen O.P., Huttunen J.K., Haapakoski J., Palmgren J., Pietinen P., Pikkarainen J., Rautalahti M.L., Virtamo J., Edwards B.K., Greenwald P. et al.; 1994**

The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group.  
*N Engl J Med* ; 330(15):1029-35

**Hirota K., Matsui M., Iwata S., Nishiyama A., Mori K., Yodoi J.; 1997**

AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1.  
*Proc Natl Acad Sci USA* ; 94(8):3633-8

**Huang H.C., Nguyen T., Pickett C.B.; 2000**

Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2.  
*Proc Natl Acad Sci USA* ; 97(23):12475-80

**Inoue H., Nojima H., Okayama H.; 1990**

High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids.  
*Gene* ; 96(1):23-8

**Ishikawa T.; 1992**

The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump.  
*Trends Biochem Sci* ; 17(11):463-8

- Itoh K., Chiba T., Takahashi S., Ishii T., Igarashi K., Katoh Y., Oyake T., Hayashi N., Satoh K., Hatayama I., Yamamoto M., Nabeshima Y.; 1997**  
An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements.  
*Biochem Biophys Res Commun* ; 236(2):313-22
- Itoh K., Wakabayashi N., Katoh Y., Ishii T., Igarashi K., Engel J.D., Yamamoto M.; 1999**  
Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain.  
*Genes Dev* ; 13(1):76-86
- Jaiswal A.K.; 1991**  
Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene structure and induction by dioxin.  
*Biochemistry* ; 30(44):10647-53
- Jaiswal A.K.; 1994a**  
Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase2. Gene structure, activity, and tissue-specific expression.  
*J Biol Chem* ; 269(20):14502-8
- Jaiswal A.K.; 1994b**  
Antioxidant response element.  
*Biochem Pharmacol* ; 48(3):439-44
- Jaiswal A.K.; 2000**  
Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases.  
*Free Radic Biol Med* ; 29(3-4):254-62
- Jedlitschky G., Cassidy A.J., Sales M., Pratt N., Burchell B.; 1999**  
Cloning and characterization of a novel human olfactory UDP-glucuronosyltransferase.  
*Biochem J* ; 340 ( Pt 3):837-43
- Jeyapaul J., Jaiswal A.K.; 2000**  
Nrf2 and c-Jun regulation of antioxidant response element (ARE)-mediated expression and induction of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene.  
*Biochem Pharmacol* ; 59(11):1433-9
- Kahl R., Weinke S., Kappus H.; 1989**  
Production of reactive oxygen species due to metabolic activation of butylated hydroxyanisole.  
*Toxicology* ; 59(2):179-94
- Karczewski J.M., Peters J.G., Noordhoek J.; 1999**  
Quinone toxicity in DT-diaphorase-efficient and -deficient colon carcinoma cell lines.  
*Biochem Pharmacol* ; 57(1):27-37
- Kensler T.W.; 1997**  
Chemoprevention by inducers of carcinogen detoxication enzymes.  
*Environ Health Perspect* ; 105 Suppl 4:965-70
- Kensler T.W., Groopman J.D., Sutter T.R., Curphey T.J., Roebuck B.D.; 1999**  
Development of cancer chemopreventive agents: oltipraz as a paradigm.  
*Chem Res Toxicol* ; 12(2):113-26
- Kerppola T.K., Curran T.; 1994**  
A conserved region adjacent to the basic domain is required for recognition of an extended DNA binding site by Maf/Nrl family proteins.  
*Oncogene* ; 9(11):3149-58
- Kress S., Reichert J., Schwarz M.; 1998**  
Functional analysis of the human cytochrome P4501A1 (CYP1A1) gene enhancer.  
*Eur J Biochem* ; 258(2):803-12
- Kubota M., Sogawa K., Kaizu Y., Sawaya T., Watanabe J., Kawajiri K., Gotoh O., Fujii-Kuriyama Y.; 1991**  
Xenobiotic responsive element in the 5'-upstream region of the human P-450c gene.  
*J Biochem (Tokyo)* ; 110(2):232-6

**Li Y., Jaiswal A.K.; 1992a**

Regulation of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene. Role of AP1 binding site contained within human antioxidant response element.

*J Biol Chem* ; 267(21):15097-104

**Li Y., Jaiswal A.K.; 1992b**

Identification of jun-B as third member in human antioxidant response element-nuclear proteins complex.

*Biochem Biophys Res Commun* ; 188(3):992-6

**Li Y., Jaiswal A.K.; 1994**

Human antioxidant-response-element-mediated regulation of type 1 NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene expression. Effect of sulfhydryl modifying agents.

*Eur J Biochem* ; 226(1):31-9

**Lilienblum W., Walli A.K., Bock K.W.; 1982**

Differential induction of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities by various inducing agents.

*Biochem Pharmacol* ; 31(6):907-13

**Lind C., Cadenas E., Hochstein P., Ernster L.; 1990**

DT-diaphorase: purification, properties, and function.

*Methods Enzymol* ; 186:287-301

**Liu S., Pickett C.B.; 1996**

The rat liver glutathione S-transferase Ya subunit gene: characterization of the binding properties of a nuclear protein from HepG2 cells that has high affinity for the antioxidant response element.

*Biochemistry* ; 35(35):11517-21

**Lowry O.H., Rosebrough H.J., Farr A.L., Randall R.J.; 1951**

Protein measurement with the folin phenol reagent.

*J Biol Chem* ; 193:265-75

**Lu S.C.; 1999**

Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies.

*FASEB J* ; 13(10):1169-83

**Mackenzie P.I.; 1990**

Principles, mechanisms and biological consequences of induction.

*Akademie-Verlag, Berlin* ; ed Ruckpaul K, Rein H : 'Frontiers in biotransformation', 2, p211-43

**Mackenzie P.I., Owens I.S., Burchell B., Bock K.W., Bairoch A., Belanger A., Fournel-Gigleux S., Green M., Hum D.W., Iyanagi T., Lancet D., Louisot P., Magdalou J., Chowdhury J.R., Ritter J.K., Schachter H., Tephly T.R., Tipton K.F., Nebert D.W.; 1997**

The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence.

*Pharmacogenetics* ; 7(4):255-69

**Meech R., Mackenzie P.I.; 1997**

UDP-glucuronosyltransferase, the role of the amino terminus in dimerization.

*J Biol Chem* ; 272(43):26913-7

**Miller A.G., Israel D., Whitlock JP J.r.; 1983**

Biochemical and genetic analysis of variant mouse hepatoma cells defective in the induction of benzo(a)pyrene-metabolizing enzyme activity.

*J Biol Chem* ; 258(6):3523-7

**Moi P., Chan K., Asunis I., Cao A., Kan Y.W.; 1994**

Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region.

*Proc Natl Acad Sci USA* ; 91(21):9926-30

**Moinova H.R., Mulcahy R.T.; 1998**

An electrophile responsive element (EpRE) regulates beta-naphthoflavone induction of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene. Constitutive expression is mediated by an adjacent AP-1 site.

*J Biol Chem* ; 273(24):14683-9

**Montano M.M., Jaiswal A.K., Katzenellenbogen B.S.; 1998**

Transcriptional regulation of the human quinone reductase gene by antiestrogen-liganded estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta.

*J Biol Chem* ; 273(39):25443-9

**Morel F., Fardel O., Meyer D.J., Langouet S., Gilmore K.S., Meunier B., Tu C.P., Kensler T.W., Ketterer B., Guillouzo A.; 1993**

Preferential increase of glutathione S-transferase class alpha transcripts in cultured human hepatocytes by phenobarbital, 3-methylcholanthrene, and dithiolethiones.

*Cancer Res* ; 53(2):231-4

**Mulcahy R.T., Wartman M.A., Bailey H.H., Gipp J.J.; 1997**

Constitutive and beta-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence.

*J Biol Chem* ; 272(11):7445-54

**Münzel P.A., Bruck M., Bock K.W.; 1994**

Tissue-specific constitutive and inducible expression of rat phenol UDP-glucuronosyltransferase.

*Biochem Pharmacol* ; 47(8):1445-8

**Münzel P.A., Bookjans G., Mehner G., Lehmkoetter T., Bock K.W.; 1996**

Tissue-specific 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-inducible expression of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6.

*Arch Biochem Biophys* ; 335(1):205-10

**Münzel P.A., Lehmkoetter T., Bruck M., Ritter J.K., Bock K.W.; 1998**

Aryl hydrocarbon receptor-inducible or constitutive expression of human UDP glucuronosyltransferase UGT1A6.

*Arch Biochem Biophys* ; 350(1):72-8

**Münzel P.A., Schmohl S., Heel H., Kalberer K., Bock-Hennig B.S., Bock K.W.; 1999**

Induction of human UDP glucuronosyltransferases (UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7) by t-butylhydroquinone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Caco-2 cells.

*Drug Metab Dispos* ; 27(5):569-73

**Nebert D.W.; 1994**

Drug-metabolizing enzymes in ligand-modulated transcription.

*Biochem Pharmacol* ; 47(1):25-37

**Nguyen T., Pickett C.B.; 1992**

Regulation of rat glutathione S-transferase Ya subunit gene expression. DNA-protein interaction at the antioxidant responsive element.

*J Biol Chem* ; 267(19):13535-9

**Nguyen T., Rushmore T.H., Pickett C.B.; 1994**

Transcriptional regulation of a rat liver glutathione S-transferase Ya subunit gene. Analysis of the antioxidant response element and its activation by the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate.

*J Biol Chem* ; 269(18):13656-62

**Nguyen T., Huang H.C., Pickett C.B.; 2000**

Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK.

*J Biol Chem* ; 275(20):15466-73

**Okey A.B., Bondy G.P., Mason M.E., Kahl G.F., Eisen H.J., Guenther T.M., Nebert D.W.; 1979**

Regulatory gene product of the Ah locus. Characterization of the cytosolic inducer-receptor complex and evidence for its nuclear translocation.

*J Biol Chem* ; 254(22):11636-48

**Okuda A., Sakai M., Muramatsu M.; 1987**

The structure of the rat glutathione S-transferase P gene and related pseudogenes.

*J Biol Chem* ; 262(8):3858-63

**Owens I.S., Gong Q., Cho J.W., Huang T., Potter C., Gholami N., Basu N.K., Kubota S., Carvalho S and Pennington M.W.; 2000**

Thirteen UDP glucuronosyltransferase genes encoded at the human UGT1 locus

*Genebank Accession Number AF297093*

**Paine P.L., Austerberry C.F., Desjarlais L.J., Horowitz S.B.; 1983**

Protein loss during nuclear isolation.  
*J Cell Biol* ; 97(4):1240-2

**Pantuck E.J., Pantuck C.B., Anderson K.E., Wattenberg L.W., Conney A.H., Kappas A.; 1984**

Effect of brussels sprouts and cabbage on drug conjugation.  
*Clin Pharmacol Ther* ; 35(2):161-9

**Peters W.H., Jansen P.L., Nauta H.; 1984**

The molecular weights of UDP-glucuronyltransferase determined with radiation-inactivation analysis. A molecular model of bilirubin UDP-glucuronyltransferase.  
*J Biol Chem* ; 259(19):11701-5

**Pinkus R., Weiner L.M., Daniel V.; 1996**

Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappaB, and glutathione S-transferase gene expression.  
*J Biol Chem* ; 271(23):13422-9

**Pinto M., Robine-Leon S., Appay M.D., Keding M., Triadou N., Dussaulx E., Lacroix B., Simon-Assmann P., Haffen K., Fogh J., Zweibaum A.; 1983**

Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture.  
*Biol Cell* ; 47:323-330

**Prescott L.F.; 1980**

Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin.  
*Br J Clin Pharmacol* ; 10 Suppl 2:291S-298S

**Prestera T., Holtzclaw W.D., Zhang Y., Talalay P.; 1993a**

Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens.  
*Proc Natl Acad Sci USA* ; 90(7):2965-9

**Prestera T., Zhang Y., Spencer S.R., Wilczak C.A., Talalay P.; 1993b**

The electrophile counterattack response: protection against neoplasia and toxicity.  
*Adv Enzyme Regul* ; 33:281-96

**Prestera T., Talalay P., Alam J., Ahn Y.I., Lee P.J., Choi A.M.; 1995**

Parallel induction of heme oxygenase-1 and chemoprotective phase 2 enzymes by electrophiles and antioxidants: regulation by upstream antioxidant-responsive elements (ARE).  
*Mol Med* ; 1(7):827-37

**Primiano T., Sutter T.R., Kensler T.W.; 1997**

Redox regulation of genes that protect against carcinogens.  
*Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* ; 118(3):487-97

**Prochaska H.J., Santamaria A.B.; 1988**

Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers.  
*Anal Biochem* ; 169(2):328-36

**Prochaska H.J., Talalay P.; 1988**

Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver.  
*Cancer Res* ; 48(17):4776-82

**Prochaska H.J., Santamaria A.B., Talalay P.; 1992**

Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens.  
*Proc Natl Acad Sci USA* ; 89(6):2394-8

**Quandt K., Frech K., Karas H., Wingender E., Werner T.; 1995**

MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data.  
*Nucleic Acids Res* ; 23(23):4878-84

**Rahman I., Smith C.A., Antonicelli F., MacNee W.; 1998**

Characterisation of gamma-glutamylcysteine synthetase-heavy subunit promoter: a critical role for AP-1.  
*FEBS Lett* ; 427(1):129-33

**Rahman I., MacNee W.; 2000**

Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation.  
*Eur Respir J* ; 16(3):534-54

**Ramos-Gomez M., Kwak M.K., Dolan P.M., Itoh K., Yamamoto M., Talalay P., Kensler T.W.; 2001**

From the Cover: Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice.  
*Proc Natl Acad Sci USA* ; 98(6):3410-5

**Ritter J.K., Chen F., Sheen Y.Y., Tran H.M., Kimura S., Yeatman M.T., Owens I.S.; 1992**

A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini.  
*J Biol Chem* ; 267(5):3257-61

**Rols M.P., Delteil C., Serin G., Teissie J.; 1994**

Temperature effects on electrotransfection of mammalian cells.  
*Nucleic Acids Res* ; 22(3):540

**Rushmore T.H., King R.G., Paulson K.E., Pickett C.B.; 1990**

Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds.  
*Proc Natl Acad Sci USA* ; 87(10):3826-30

**Rushmore T.H., Pickett C.B.; 1990**

Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants.  
*J Biol Chem* ; 265(24):14648-53

**Rushmore T.H., Morton M.R., Pickett C.B.; 1991**

The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity.  
*J Biol Chem* ; 266(18):11632-9

**Sabolovic N., Magdalou J., Netter P., Abid A.; 2000**

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and phenols glucuronidation in Caco-2 cells: identification of the UDP-glucuronosyltransferases UGT1A6, 1A3 and 2B7.  
*Life Sci* ; 67(2):185-96

**Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.; 1989**

Molecular cloning: a laboratory manual.  
*Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor* ;

**Schmohl S.; 1998**

Expression und Regulation der Morphin-UDP-Glucuronosyltransferase ( UGT2B7 ) in Geweben und Zellen des menschlichen Gastrointestinaltrakts.  
*Diplomarbeit ( Physiologische Chemie und Biochemie, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen )*

**Scurlock R., Rougee M., Bensasson R.V.; 1996**

Redox properties of diphenols and their correlation to induction of enzyme synthesis.  
*Z Phys Chem* ; 196 Part 1 : 85-92

**Spencer S.R., Wilczak C.A., Talalay P.; 1990**

Induction of glutathione transferases and NAD(P)H:quinone reductase by fumaric acid derivatives in rodent cells and tissues.  
*Cancer Res* ; 50(24):7871-5

**Stoner G.D., Morse M.A., Kelloff G.J.; 1997**

Perspectives in cancer chemoprevention.  
*Environ Health Perspect* ; 105 Suppl 4:945-54

**Strassburg C.P., Oldhafer K., Manns M.P., Tukey R.H.; 1997**

Differential expression of the UGT1A locus in human liver, biliary, and gastric tissue: identification of UGT1A7 and UGT1A10 transcripts in extrahepatic tissue.  
*Mol Pharmacol* ; 52(2):212-20

**Strassburg C.P., Manns M.P., Tukey R.H.; 1998**

Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8.

*J Biol Chem* ; 273(15):8719-26

**Strassburg C.P., Kneip S., Topp J., Obermayer-Straub P., Barut A., Tukey R.H., Manns M.P.; 2000**

Polymorphic gene regulation and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine.

*J Biol Chem* ; 275(46):36164-71

**Suzuki T., Smith S., Board P.G.; 1994**

Structure and function of the 5' flanking sequences of the human alpha class glutathione S-transferase genes.

*Biochem Biophys Res Commun* ; 200(3):1665-71

**Talalay P., De Long M.J., Prochaska H.J.; 1988**

Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis.

*Proc Natl Acad Sci USA* ; 85(21):8261-5

**Talalay P., Fahey J.W., Holtzclaw W.D., Prestera T., Zhang Y.; 1995**

Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction.

*Toxicol Lett* ; 82-83:173-9

**Tukey R.H., Strassburg C.P.; 2001**

Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract.

*Mol Pharmacol* ; 59(3):405-14

**van den Hoff M.J., Christoffels V.M., Labruyere W.T., Moorman A.F., Lamers W.H.; 1995**

Electrotransfection with "intracellular" buffer.

*Methods Mol Biol* ; 48:185-97

**Vasiliou V., Puga A., Chang C.Y., Tabor M.W., Nebert D.W.; 1995**

Interaction between the Ah receptor and proteins binding to the AP-1-like electrophile response element (EpRE) during murine phase II [Ah] battery gene expression.

*Biochem Pharmacol* ; 50(12):2057-68

**Venugopal R., Jaiswal A.K.; 1996**

Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene.

*Proc Natl Acad Sci USA* ; 93(25):14960-5

**Venugopal R., Jaiswal A.K.; 1998**

Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes.

*Oncogene* ; 17(24):3145-56

**Visser T.J., Kaptein E., Gijzel A.L., de Herder W.W., Ebner T., Burchell B.; 1993**

Glucuronidation of thyroid hormone by human bilirubin and phenol UDP-glucuronyltransferase isoenzymes.

*FEBS Lett* ; 324(3):358-60

**Wang B., Williamson G.; 1994**

Detection of a nuclear protein which binds specifically to the antioxidant responsive element (ARE) of the human NAD(P) H:quinone oxidoreductase gene.

*Biochim Biophys Acta* ; 1219(3):645-52

**Wasserman W.W., Fahl W.E.; 1997a**

Functional antioxidant responsive elements.

*Proc Natl Acad Sci USA* ; 94(10):5361-6

**Wasserman W.W., Fahl W.E.; 1997b**

Comprehensive analysis of proteins which interact with the antioxidant responsive element: correlation of ARE-BP-1 with the chemoprotective induction response.

*Arch Biochem Biophys* ; 344(2):387-96

**Wattenberg L.W.; 1972**

Inhibition of carcinogenic and toxic effects of polycyclic hydrocarbons by phenolic antioxidants and ethoxyquin.

*J Natl Cancer Inst* ; 48(5):1425-30

**Wattenberg L.W.; 1985**

Chemoprevention of cancer.  
*Cancer Res* ; 45(1):1-8

**Wefers H., Sies H.; 1983**

Hepatic low-level chemiluminescence during redox cycling of menadione and the menadione-glutathione conjugate: relation to glutathione and NAD(P)H:quinone reductase (DT-diaphorase) activity.  
*Arch Biochem Biophys* ; 224(2):568-78

**Whitlock J.P.Jr., Galeazzi D.R.; 1984**

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin receptors in wild type and variant mouse hepatoma cells. Nuclear location and strength of nuclear binding.  
*J Biol Chem* ; 259(2):980-5

**Wild A.C., Gipp J.J., Mulcahy T.; 1998**

Overlapping antioxidant response element and PMA response element sequences mediate basal and beta-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit gene.  
*Biochem J* ; 332 ( Pt 2):373-81

**Wild A.C., Moinova H.R., Mulcahy R.T.; 1999**

Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2.  
*J Biol Chem* ; 274(47):33627-36

**Wingender E., Chen X., Hehl R., Karas H., Liebich I., Matys V., Meinhardt T., Pruss M., Reuter I., Schacherer F.; 2000**

TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation.  
*Nucleic Acids Res* ; 28(1):316-9

**Wong H., Anderson W.D., Cheng T., Riabowol K.T.; 1994**

Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: the "primer-dropping" method.  
*Anal Biochem* ; 223(2):251-8

**Xie T., Belinsky M., Xu Y., Jaiswal A.K.; 1995**

ARE- and TRE-mediated regulation of gene expression. Response to xenobiotics and antioxidants.  
*J Biol Chem* ; 270(12):6894-900

**Xu X., Stambrook P.J.; 1994**

Two murine GSTpi genes are arranged in tandem and are differentially expressed.  
*J Biol Chem* ; 269(48):30268-73

**Yoshioka K., Deng T., Cavigelli M., Karin M.; 1995**

Antitumor promotion by phenolic antioxidants: inhibition of AP-1 activity through induction of Fra expression.  
*Proc Natl Acad Sci USA* ; 92(11):4972-6

**Yu R., Chen C., Mo Y.Y., Hebbar V., Owuor E.D., Tan T.H., Kong A.N.; 2000**

Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism.  
*J Biol Chem* ; 275(51):39907-13

**Akademische Lehrer**

Albert K.  
Anderer A.  
Bayer E.  
Bisswanger H.  
Bock K.W.  
Bohley P.  
Braun V.  
Breyer-Pfaff U.  
Buchmann A.  
Eisele K.  
Fröhlich K.-U.  
Gauglitz G.  
Gebhardt R.  
Götz F.  
Günzl H.  
Häfelinger G.  
Hagenmaier H.  
Hamprecht B.  
Hanack M.  
Hoffmann V.  
Jung G.  
Kissling G.  
Krug D.  
Lindner E.  
Mayer W.-E.  
Mecke D.  
Metzner H.  
Münzel P.A.  
Nagel U.  
Nakel W.  
Ninnemann H.  
Oberhammer H.  
Oelkrug D.  
Pfaff E.  
Pfeiffer W.  
Pommer H.  
Poralla K.  
Probst H.  
Rau O.  
Reinecke H.J.  
Reutter K.  
Schrenk D.  
Schurig V.  
Schwarz M.  
Staudt G.  
Stegmann H.  
Strähle J.  
Voelter W.  
Weber U.  
Wegmann K.  
Weser U.  
Werringloer J.  
Wiesinger H.

## Tabellarischer Lebenslauf

Name :		Stefan Schmohl
Geboren :	15/2/1966	in Esslingen am Neckar
Eltern :		Eberhard Schmohl Monika, geb. Hartmann
Schulbildung :	ab 1972	Grundschule ( Grund- und Hauptschule Sulzgries in Esslingen am Neckar )
	ab 1976	Gymnasium ( Theodor-Heuss-Gymnasium, Schelztorgymnasium, Technisches Gymnasium der Friedrich-Ebert-Schule in Esslingen am Neckar )
	6/1986	Abitur mit allgemeiner Hochschulreife
Zivildienst :	ab 2/1987	in der Chirurgischen Intensivstation
	bis 9/1988	des Krankenhauses Esslingen am Neckar
Berufsausbildung :	ab 9/1988	Ausbildung zum Schreiner-Gesellen
	2/1991	Gesellenbrief
Berufstätigkeit :	1991	als Schreiner
Studium :	ab 9/1991	Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
	9/1993	Abschluß des ersten Teils der Diplomvorprüfungen in den Fächern Botanik, Zoologie, Anatomie und Physik
	10/1994	Abschluß des Grundstudiums mit dem zweiten Teil der Diplomvorprüfungen in den Fächern Anorganische, Organische, Physikalische und Physiologische Chemie
	ab 10/1994	Hauptstudium in der Fachrichtung Toxikologie / Analytische Chemie
	1/1997	Diplomhauptprüfung erster Teil im Fach Analytische Chemie
	10/1997	Diplomhauptprüfung zweiter Teil in den Fächern Biochemie und Toxikologie
Diplomarbeit :	ab 10/1997	unter der Anleitung von Prof. Dr. K.W. Bock am Institut für Toxikologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen mit dem Thema : 'Expression und Regulation der Morphin-Glucuronosyltransferase ( UGT2B7 ) in menschlichen Zellen des Gastrointestinaltrakts'.
	bis 7/1998	
Dissertation :	ab 9/1998	unter der Anleitung von Prof. Dr. K.W. Bock am Institut für Toxikologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen mit dem Thema : 'Transkriptionelle Aktivierung der humanen UDP-Glucuronosyltransferase Isoform UGT1A6 durch Induktoren vom Antioxidantien-Typ'.
	bis 2/2001	