

Institut für Ernährungswissenschaft
Abteilung Biochemie der Ernährung

**Ursachen und Folgen vermehrter Expression des nukleären
Rezeptors Constitutiver-Androstan-Rezeptor (NR1I3) durch
Agonisten des nukleären Rezeptors Peroxisomenproliferator-
aktivierter-Rezeptor-alpha (NR1C1)**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin "Ernährungswissenschaft"**

**eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam**

**von
Nadine Wieneke
aus Luckenwalde**

Potsdam, den 11.02.2008

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen
Bedingungen 2.0 Deutschland

Um die Lizenz anzusehen, gehen Sie bitte zu:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.0/de/>

Elektronisch veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2008/1916/>
urn:nbn:de:kobv:517-opus-19167

[<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-19167>]

A INHALTSVERZEICHNIS

A	INHALTSVERZEICHNIS	I
B	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	X
C	VERZEICHNIS DER TABELLEN	XIII
D	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	XIV
E	ZUSAMMENFASSUNG	XVIII
1	EINLEITUNG	1
1.1	Nukleäre Rezeptoren	1
1.1.1	Die Nomenklatur der nukleären Rezeptoren	1
1.1.2	Die Struktur und die Funktion der nukleären Rezeptoren	2
1.1.3	Die Coregulatoren von nukleären Rezeptoren	6
1.1.4	Die Phasen der Biotransformation und die Rolle nukleärer Rezeptoren	7
1.2	Der Constitutive-Androstan-Rezeptor (CAR)	9
1.2.1	Das Vorkommen und die Funktion von CAR	9
1.2.2	Die Regulation der CAR-Expression	10
1.2.3	Aktivatoren und Zielgene von CAR	11
1.2.4	Das CAR-Zielgen Cytochrom P450 2B1	12
1.3	Der Peroxisomenproliferator-aktivierte-Rezeptor-alpha (PPARα)	13
1.3.1	Das Vorkommen und die Funktion von PPAR α	13
1.3.2	Die Regulation der PPAR α -Expression	14
1.3.3	Aktivatoren und Zielgene von PPAR α	14
1.4	Weitere nukleäre Rezeptoren der Leber	15
1.4.1	Der Pregnan-X-Rezeptor (PXR)	15
1.4.2	Der Farnesoid-X-Rezeptor (FXR)	16
1.4.3	Der Leber-X-Rezeptor- α (LXR α)	16
1.4.4	Der Hepatische-Nukleäre-Faktor-4- α (HNF4 α)	17

1.5	Die Zielstellung	18
2	MATERIAL	19
2.1	Tiere und Tierhaltung	19
2.2	Biochemikalien	19
2.3	Verbrauchsmaterialien	22
2.4	Geräte	23
2.5	Zellkultur-Medien	25
2.6	Käufliche Reinigungs- und Nachweissysteme	27
2.7	Enzyme	28
2.8	Oligonukleotide	28
2.8.1	'sense'-Oligonukleotide	28
2.8.2	'antisense'-Oligonukleotide	29
2.9	Molekulare Längenstandards	31
2.9.1	Protein-Längenstandard	31
2.9.2	DNA-Längenstandard	31
2.10	Vektoren	31
2.10.1	pGL3-Basic-Vektor	31
2.10.2	pJet-Vektor	32
2.11	<i>E.coli</i> XL-1 (blue) Bakterien	33
2.12	Antikörper	33
2.12.1	Monoklonale Antikörper	33
2.12.2	Polykonale Antikörper	33
3	METHODEN	35
3.1	Die Isolierung von Hepatozyten der Ratte nach Meredith (1988)	35
3.1.1	Puffer und Lösungen	35
3.1.2	Die nicht rezirkulierende <i>in situ</i> -Perfusion der Rattenleber zur Isolierung von Hepatozyten	37

3.1.3	Die Präparation von Hepatozyten der Ratte	38
3.1.4	Die Reinigung von Hepatozyten der Ratte durch Dichtegradienten-Zentrifugation	38
3.1.5	Die mikroskopische Zellzählung	38
3.2	Zellkulturversuche zur Expression von Cytochrom P450 2B1 in Hepatozyten der Ratte	39
3.2.1	Puffer und Lösungen	39
3.2.2	Die Herstellung Collagen-beschichteter Zellkulturschalen	41
3.2.3	Die Optimierung der Kulturbedingungen für die Cytochrom P450 2B1-Expression in Hepatozyten der Ratte	42
3.2.4	Die optimierten Hepatozyten-Kulturbedingungen für die CYP2B1-Expression	43
3.2.5	Die Untersuchung des Einfluss eines G _s -gekoppelten Signalweges auf die CAR-Expression	43
3.3	Zellkulturversuche zur Untersuchung der Transkription von CAR und dem CAR-Zielgen CYP2B1 in Hepatozyten der Ratte	43
3.3.1	Das Prinzip	43
3.3.2	Puffer und Lösungen	44
3.3.3	Die Transfektion von Hepatozyten	45
3.4	Die Präparation von Mikrosomen der Ratte	45
3.4.1	Puffer und Lösungen	45
3.4.2	Die Mikrosomenpräparation	48
3.4.3	Die Proteinbestimmung nach Lowry <i>et al.</i> (1951)	48
3.5	Die Präparation von Zelllysaten aus Hepatopzyten der Ratte	49
3.5.1	Puffer und Lösungen	49
3.5.2	Die Herstellung von Zelllysaten aus Hepatozyten der Ratte	50
3.5.3	Die Proteinbestimmung nach BRADFORD <i>et al.</i> (1976)	50
3.6	Die fluorenspektrometrische Bestimmung der Cytochrome P450 2B 7-Pentoxyresorufin-O-Depentylase-Aktivität in Mikrosomen	50
3.6.1	Puffer und Lösungen	50
3.6.2	Die fluoreszenzspektrometrische Messung in Mikrosomen	52
3.7	Der immunologische Nachweis von Cytochrom P450 2B in Mikrosomen und CAR in Zelllysaten durch Westernblot-Analyse	53
3.7.1	Puffer und Lösungen	53
3.7.2	Die Vorbereitung der Proben für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	55

3.7.3	Die Vorbereitung der Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE	56
3.7.4	Die Trennung der Proteine durch SDS-PAGE	57
3.7.5	Der Transfer der getrennten Proteine auf PVDF-Membranen durch Western-Blot	57
3.7.6	Der Nachweis der geblotteten Proteine durch Ponceau-S-Färbung	57
3.7.7	Der immunologische Nachweis von Cytochrom P450 2B bzw. CAR durch Immunperoxidase-Färbung der geblotteten Proteine	58
3.8	Der Nachweis der Luciferase-Reportergenaktivität	58
3.8.1	Das Prinzip	58
3.8.2	Puffer und Lösungen	59
3.8.3	Die Durchführung des Luciferase-Assays	59
3.9	Die Isolierung von Gesamt-RNA mit Hilfe des Kits "SV Total RNA Isolierungs-System" aus Hepatozyten der Ratte	60
3.9.1	Puffer und Lösungen	60
3.9.2	Die Isolierung von Gesamt-RNA mit Hilfe des SV Total RNA Isolierungs-Systems der Firma Promega	61
3.10	Der Nachweis von CAR- bzw. CPT1-mRNA mit Hilfe der „Real-Time“-quantitativen-PCR in Hepatozyten der Ratte	61
3.10.1	Puffer und Lösungen	61
3.10.2	Die Synthese von cDNA-mRNA-Hybriden	62
3.10.3	Die Protokolle für die <i>Real-Time</i> -quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (RTQ-PCR) mit Hilfe des iCycler™	63
3.11	Der Nachweis von Acyl CoA Oxidase 1 (ACO1)- und CYP2B1-mRNA mit Hilfe der Northernblot-Analyse in Hepatozyten der Ratte	64
3.11.1	Puffer und Lösungen	64
3.11.2	Die Isolierung von Gesamt-RNA mit Hilfe der Phenol/ Chloroform-Methode aus Hepatozyten der Ratte	68
3.11.3	Die Auftrennung von RNA in Agarosegelen	69
3.11.4	Der Transfer der getrennten RNA auf Nylon-Membranen durch Northern-Blot	69
3.11.5	Der Nachweis der getrennten RNA auf Nylon-Membranen	70
3.11.6	Die Rehybridisierung von Nylon-Membranen	71
3.12	Die Herstellung von CAR-Promotorfragmenten der Ratte	71
3.12.1	Puffer und Lösungen	71
3.12.2	Die Isolierung genomischer DNA aus Hepatozyten der Ratte	73
3.12.3	PCR mit genomischer DNA aus Hepatozyten der Ratte als Matrize	74

3.12.4	PCR mit pGL3rCARprom1,9 als Matrize	75
3.12.5	Der Verdau von pGL3rCARprom1,9 zur Gewinnung verkürzter CAR-Promotorfragmente	76
3.13	Die Herstellung von CYP2B1-Promotorfragmenten der Ratte	77
3.13.1	Puffer und Lösungen	77
3.13.2	PCR mit pGL3C2B1 als Matrize	78
3.13.3	Mutations-PCR mit pGL3C2B1 als Matrize	78
3.13.4	Der Verdau von pGL3C2B1 und der CYP2B1-Promotorfragmente PPARmut und ER4mut zur Gewinnung neuer CYP2B1-Promotormutationskonstrukte	80
3.13.5	Der Verdau von pGL3CD2 und der CYP2B1-Promotorfragmente CD2A-D zur Gewinnung neuer CYP2B1-Promotordeletionskonstrukte	81
3.13.6	Der Verdau von pGL3CD2A und pGL3CD2C zur Gewinnung des neuen CYP2B1-Promotordeletionskonstrukts pGL3CD2E	82
3.14	Die Herstellung von DNA-Fragmenten für die PCR-Standards	82
3.14.1	Puffer und Lösungen	82
3.14.2	PCR zur Herstellung der RTQ-PCR-Standards	83
3.15	Die Agarosegel-Elektrophorese	83
3.15.1	Puffer und Lösungen	83
3.15.2	Die Auftrennung von DNA in Agarosegelen	84
3.15.3	Die Reinigung von DNA aus Agarosegelen mit dem ‚MinElute Gel Extraction‘-Kit	85
3.16	Die Klonierung der Promotorfragmente und der RTQ-PCR-Standards in den pJET-Vektor	85
3.16.1	Puffer und Lösungen	85
3.16.2	Die Ligation des Promotorfragmentes bzw. der PCR-Standards in den pJET-Vektor	86
3.16.3	Die Überprüfung der Orientierung der CAR-Promotorfragmente in pJET	87
3.16.4	Der Verdau der Promotorfragmente für die Umklonierung aus pJET in pGL3basic	87
3.17	Die Klonierung der Promotorfragmente in pGL3basic	90
3.17.1	Puffer und Lösungen	90
3.17.2	Die Ligation der Promotorfragmente in den pGL3-Basic-Vektor	90
3.18	Die Transformation kompetenter <i>E.coli</i> XL-1 (blue)-Zellen durch Elektroporation	91
3.18.1	Puffer und Lösungen	91

3.18.2	Die Herstellung kompetenter E.coli XL-1 (blue)-Zellen für die Elektroporation	93
3.18.3	Die Transformation kompetenter E.coli XL-1 (blue)-Zellen durch Elektroporation	93
3.19	Die Analyse rekombinanter Bakterienkolonien durch Plasmidpräparation im Mini-Maßstab	94
3.19.1	Puffer und Lösungen	94
3.19.2	Die Reinigung von Plasmid-DNA durch Affinitäts-Chromatografie im Mini-Maßstab	95
3.19.3	Die spezifische Spaltung der Plasmid-DNA zum Nachweis der erfolgreichen Klonierung	95
3.20	Die Sequenzierung der Promotorkonstrukte mit dem Kapillarelektrophorese-Sequencer	96
3.20.1	Das Prinzip	96
3.20.2	Puffer und Lösungen	96
3.20.3	Die Sequenzierungsreaktionen und Aufarbeitung der Sequenzierproben	97
3.21	Die Isolierung der Plasmid-DNA im Maxi-Maßstab	98
3.21.1	Puffer und Lösungen	98
3.21.2	Die Isolierung der Plasmid-DNA durch Affinitäts-Chromatografie im Maxi-Maßstab	99
3.22	Die Untersuchung des zentralen DR1-Motiv des CAR-Promotors der Ratte mit Hilfe des EMSA (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)	99
3.22.1	Puffer und Lösungen	99
3.22.2	Die Kultivierung der Hepatozyten	101
3.22.3	Die Kernextraktion von Hepatozyten der Ratte	101
3.22.4	Der Nachweis spezifischer Kernprotein-DNA-Wechselwirkungen (EMSA)	102
3.23	Die Untersuchung zur Bindung von PPARα an das zentrale DR1-Motiv durch Chromatin-Immunpräzipitation	104
3.23.1	Puffer und Lösungen	104
3.23.2	Die Kultivierung und Aufarbeitung der Hepatozyten	105
3.23.3	Die Immunpräzipitation von PPAR α	106
3.23.4	Die Aufreinigung der genomischen DNA aus den Immunpräzipitaten	107
3.23.5	Der Nachweis der Bindung von PPAR α an das zentrale DR1-Motiv durch Polymerasekettenreaktion (PCR)	107
3.24	Die CYP2B-Aktivität <i>in vivo</i> in Abhängigkeit von der Phenobarbital-Konzentration	107
3.24.1	Puffer und Lösungen	108

3.24.2	Tiere und Tierhaltung während des Versuchs	108
3.24.3	Die Mikrosomenpräparation	108
3.24.4	Die CYP2B-Aktivität <i>in vivo</i> in Abhängigkeit von der Phenobarbitalkonzentration	109
3.25	Der Einfluss des PPARα-Agonisten WY 14643 auf die CYP2B-Aktivität und CAR-Expression <i>in vivo</i> in Leber der Ratte	109
3.25.1	Puffer und Lösungen	109
3.25.2	Die Tiere und die Tierhaltung während des Versuchs	110
3.25.3	Die Mikrosomenpräparation	110
3.25.4	Der Einfluss von WY 14643 auf die PB-abhängige CYP2B-Aktivität <i>in vivo</i>	110
3.25.5	Der Einfluss von WY 14643 auf die CAM-Expression <i>in vivo</i>	110
3.26	Der Einfluss von Olivenöl und Fischöl auf die CAR-mRNA-Expression <i>in vivo</i> in Leber der Ratte	111
3.26.1	Puffer und Lösungen	111
3.26.2	Tiere und Tierhaltung während des Versuchs	111
3.26.3	Der Einfluss von Olivenöl und Fischöl auf die CAR-Expression <i>in vivo</i>	111
4	ERGEBNISSE	112
4.1	Die CAR-abhängige Cytochrom P450 2B-Expression <i>in vitro</i> als Modell der CAR / PPARα Agonisten-Interaktion in Hepatozyten der Ratte	112
4.1.1	Die Optimierung der Kulturbedingungen für die spezifische 7-Pentoxyresorufin-O-Depentylierungs-Aktivität des Cytochrome P450 2B	112
4.1.2	Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die mRNA Expression des PPAR α -Zielgens Acyl CoA Oxidase 1	114
4.1.3	Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf CYP2B-Expression	114
4.1.4	Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf CYP2B-Aktivität	116
4.1.5	Der Einfluss einer hohen Insulinkonzentration auf die CYP2B-Aktivität	122
4.2	Molekulare Mechanismen der PPARα-Agonisten-vermittelten Steigerung der Phenobarbital-abhängigen CYP2B1 Expression	122
4.2.1	Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CYP2B1-Transkription	124
4.2.2	Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CAR-Expression	126
4.2.3	Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die Aktivierung des Ratten CAR-Promotors	128
4.2.4	Die Untersuchung der DR1-Motive im Ratten-CAR-Promotor	131

4.2.5	Der Einfluss des cAMP/PKA-Signalweges auf die PPAR α -Agonisten-vermittelte CAR-Promotoraktivität	136
4.2.6	Die PBREM-unabhängige Aktivierung des CYP2B1-Promotors durch PPAR α -Agonisten	138
4.2.7	Der Einfluss von mRXR α -Überexpression auf die CYP2B1-Promotoraktivität	141
4.3	Der Einfluss von Prostaglandin D₂ auf die Expression des CAR-Zielgens CYP2B1	142
4.3.1	Der Einfluss von PGD ₂ auf die PB-abhängige CYP2B1-Expression	142
4.3.2	Der Einfluss von PGD ₂ auf die CYP2B1-Aktivität	143
4.3.3	Der Einfluss von PGD ₂ auf die CYP2B1-Promotoraktivität	144
4.3.4	Der Einfluss von PGD ₂ auf die CAR- und CPT1-Expression	145
4.3.5	Der Einfluss von PGD ₂ auf die CAR-Promotoraktivität	146
4.4	Die Steigerung der PB-abhängigen CYP2B-Aktivität in Rattenleber durch <i>in vivo</i> Stimulation mit einem PPARα-Agonist	147
4.4.1	Die Induktion der CYP2B-Aktivität <i>in vivo</i> in Abhängigkeit von der Phenobarbitaldosis in Rattenleber	147
4.4.2	Die Induktion der CYP2B-Aktivität <i>in vivo</i> durch den PPAR α -Agonisten WY 14643 in Leber der Ratte	149
4.4.3	Die Induktion der CAR-Expression <i>in vivo</i> durch den PPAR α -Agonisten WY 14643 in Leber der Ratte	150
4.4.4	Die Induktion der CAR-Expression <i>in vivo</i> durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren	150
5	DISKUSSION	153
5.1	Die PPARα-Agonisten-vermittelte Expression von CAR	153
5.1.1	Die Ursachen der PPAR α -Agonisten-vermittelten Steigerung der CAR-Expression	153
5.1.2	Die Folgen einer PPAR α -abhängigen CAR-Transkription für die Expression von CAR-Zielgenen	155
5.1.3	Die Beeinflussung der CAR-Aktivität und CYP2B1-Expression unabhängig von der CAR-Expression	157
5.1.4	Die Bedeutung von PGD ₂ als Verstärker der PB-abhängigen Expression von CAR-Zielgenen	159

5.2	Die Bedeutung einer PPARα-abhängigen Induktion von CAR bei der Anpassung des Stoffwechsels an Nahrungskarenz	160
5.2.1	Die Bedeutung von PPAR α	160
5.2.2	Die Beeinflussung des CAR-vermittelten Thyroidhormon-Stoffwechsels durch PPAR α	161
5.2.3	Die Beeinflussung der Nahrungsaufnahme durch CAR und PPAR α	162
5.3	Die Bedeutung einer PPARα-abhängigen Induktion von CAR für weitere Stoffwechselwege	163
5.3.1	Die Beeinflussung des Fremdstoffmetabolismus durch eine PPAR α -abhängige Induktion von CAR	163
5.3.2	Die Beeinflussung des Cholesterol- und Gallensäuremetabolismus durch eine PPAR α -abhängige Induktion von CAR	165
5.4	Schlussfolgerung	167
6	LITERATURVERZEICHNIS	169

B VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 1:	Die Modulstruktur nukleärer Rezeptoren	3
Abb. 2:	Die DNA-Bindedomäne (DBD) nukleärer Rezeptoren	4
Abb. 3:	Die Ligand-Bindedomäne (LBD) nukleärer Rezeptoren (Aranda und Pascual 2001)	6
Abb. 4:	Die Wechselwirkungen zwischen Fremdstoffen und endogenen Regulationswegen (Waxman 1999)	8
Abb. 5:	Die Restriktionskarte des Vektors pGL3-Basic.	32
Abb. 6:	Die Restriktionskarte des Vektors pJet1/blunt.	33
Abb. 7:	Ein Beispiel für den Aufbau eines Northern-Blot-Transfers.	70
Abb. 8:	Die 7-Pentoxyresorufin-O-Depentylierungs-Aktivität des CYP2B unter verschiedenen Kulturbedingungen.	113
Abb. 9:	Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die ACO I mRNA-Expression.	115
Abb. 10:	Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CYP2B1 mRNA-Expression.	116
Abb. 11:	Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CYP2B1-Protein-Expression.	117
Abb. 12:	Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CYP2B-Aktivität.	118
Abb. 13:	Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CYP2B-Aktivität unter Berücksichtigung der Behandlungsdauer	119
Abb. 14:	Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CYP2B-Aktivität in Abhängigkeit von der Dosis.	120
Abb. 15:	Der Einfluss der Phenobarbitaldosis auf die PPAR α -Agonisten-vermittelte CYP2B-Aktivität.	121
Abb. 16:	Der Einfluss einer hohen Insulinkonzentration auf die PPAR α -Agonisten- vermittelte Steigerung der PB-abhängigen CYP2B-Aktivität.	123

Abb. 17:	Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CYP2B1-Promotoraktivierung.	125
Abb. 18:	Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CAR-mRNA-Expression.	126
Abb. 19:	Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CAR-Protein-Expression.	127
Abb. 20:	Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die rCAR-Promotoraktivität.	129
Abb. 21:	Der Einfluss von Insulin auf die PPAR α -Agonisten-vermittelte Steigerung der rCAR-Promotoraktivität.	130
Abb. 22:	Der Einfluss des proximalen rCAR-Promotorbereichs auf die PPAR α -Agonisten-vermittelte Promotoraktivierung.	132
Abb. 23:	Der Einfluss der DR1-Motive des rCAR-Promotors auf dessen PPAR α -Agonisten-vermittelte Aktivierung.	133
Abb. 24:	Die Bindung von Kernproteinen an das zentrale DR1-Motiv.	134
Abb. 25:	Die Bindung von PPAR α an das zentrale DR1-Motiv.	135
Abb. 26:	Der Einfluss des cAMP/PKA-Signalweges auf die PPAR α -Agonisten-vermittelte CAR-Promotoraktivität.	137
Abb. 27:	Der Einfluss des cAMP/PKA-Signalweges auf die PPAR α -Agonisten-vermittelte CAR-mRNA-Expression.	138
Abb. 28:	Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf Aktivierung des proximalen CYP2B1-Promotorbereichs	140
Abb. 29:	Der Einfluss von mRXR α -Überexpression auf die CYP2B1-Promotoraktivität.	142
Abb. 30:	Der Einfluss von PGD ₂ auf die PB-abhängige CYP2B1-Expression.	143
Abb. 31:	Der Einfluss von PGD ₂ auf die PB-abhängige CYP2B1-Aktivität.	144
Abb. 32:	Der Einfluss von PGD ₂ auf die CYP2B1-Promotoraktivität.	145
Abb. 33:	Der Einfluss von PGD ₂ auf die CAR- und CPT1-mRNA-Expression.	146
Abb. 34:	Der Einfluss von PGD ₂ auf die CAR-Promotoraktivität.	147

Abb. 35:	Die 7-Pentoxyresorufin-O-Depentylierungs-Aktivität des CYP2B1 der Rattenleber in Abhängigkeit von der Phenobarbitaldosis.	148
Abb. 36:	Die Steigerung der CYP2B1-Aktivität in Rattenleber durch einen PPAR α -Agonisten.	149
Abb. 37:	Die Steigerung der CAR-Expression in Rattenleber durch einen PPAR α -Agonisten.	151
Abb. 38:	Die Steigerung der CAR-Expression in Rattenleber durch Fettsäuren.	152
Abb. 39:	Mögliches Schema der PPAR α -Agonisten-vermittelten Induktion von CAR am Beispiel des CAR-Zielgens CYP2B1.	157
Abb. 40:	Vereinfachtes Schema des Substratflusses in der Leber bei Nahrungskarenz	160
Abb. 41:	Das Netzwerk nukleärer Rezeptoren zur Regulation des Cholesterol- und Gallensäuremetabolismus in Nagern.	166

C VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tab. 1:	Die Nomenklatur der nukleären Rezeptoren (Escriva, <i>et al.</i> 2000, Germain, <i>et al.</i> 2006)	2
---------	--	---

D VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ACO	Acyl-CoA-Oxidase
AF	Aktivierungsfunktion
Ah-R	Aryl-hydrocarbon-Rezeptor
Amp	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
APP	Akut-Phase-Protein
AR	Androgen-Rezeptor
Bacs	<i>bile acid-CoA synthetase</i> (Gallensäure-CoA Synthetase)
BAR	<i>bile acid receptor</i> (Gallensäure-Rezeptor)= FXR
Bat	<i>bile acid-CoA: amino acid N-acetyltransferase</i> (Gallensäure-CoA: Aminosäure-N-Acetyltransferase)
BIEN	Bifunktionales Enzym
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
BSEP	<i>bile salt export pump</i> (Gallensalz-Exportpumpe)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CAR	Constitutiver-Androstan-Rezeptor
CBP	CREB Bindeprotein
CCRP	Cytoplasmatisches CAR-Retentionsprotein
C/EBP	CCAAT-Enhancer Binding Protein (-Verstärker-Bindungsprotein)
CPT	Carnityl-Palmityltransferase
CREB	cAMP-responsives Element Bindeprotein
CTE	<i>C-terminal extension</i> (C-terminale Verlängerung)
CYP450	Cytochrom P450
DBD	DNA-Bindedomäne
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DP-R	Prostaglandin D ₂ -Rezeptor (<u>D</u> - <u>P</u> rostaglandin- <u>R</u> ezeptor)
DR	Direct repeat (direkte Wiederholung)
DRIP	Vitamin-D-Rezeptor-interagierendes-Protein
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum

ER	Estrogen Receptor (Östrogen-Rezeptor)
FABP	<i>fatty acid binding protein</i> (Fettsäure-Bindeprotein)
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FCS	Fetal calf serum (Fötale Kälberserum)
FMN	Flavin-Mononucleotid
FXR	Farnesoid-X-Rezeptor
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCNF1	germ cell nuclear factor 1
GLUT2	Glucosetransporter 2
G-Protein	Guanin-Nucleotid-bindendes Protein
gp130	Glycoprotein 130
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
GRE	Glucocorticoid Responsives Element
GST	Gluthation-S-Transferase
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDL	<i>high density lipoprotein</i> (Lipoprotein hoher Dichte)
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA
HMW-Standard	High Molecular Weight-Standard
HEPES	2-(4-/2-Hydroxyethyl)-Piperaziny-1-Ethansulfonat
HNF4 α	Hepatischer-Nukleärer-Faktor 4 α
iBAPB	<i>ileal bile acid binding protein</i> (Ileales Gallensäure-Bindeprotein)
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin-6
IR	<i>inverted repeat</i> (Palindrom)
ITS	Insulin-Transferrin-Natriumselenit
kb	Kilobasenpaare
KG	Körpergewicht
LBD	Ligand-Bindedomäne
LBP	<i>Ligand binding pocket</i> (Ligand-Bindetasche)
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
LCAS	<i>long chain acyl-CoA synthase</i> (Langkettige-Acyl-CoA Synthase)
LCAD	<i>long chain acyl-CoA dehydrogenase</i> (Langkettige-Acyl-CoA Dehydrogenase)
Luc	Luciferasegen
LXR	Leber-X-Rezeptor
mAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-Aktivierte-Proteinkinase
MDR	<i>multidrug resistance protein</i> (Multidrogen-Resistenz-Protein)

MODY	<i>maturity onset diabetes of the young</i>
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
N-CoR	Nukleärer Rezeptor Corepressor
NCS	<i>newborn calf serum</i> (Neonatales Kälberserum)
NGF1-B	nerve growth factor induced clone B
NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz
n.b.	nicht bekannt
NR	Nukleärer Rezeptor
ori	Origin of replication (Replikationsstart)
PB	Phenobarbital
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCN	Pregnenolon-16 α -Carbonitril
PG	Prostaglandin
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PKA	Proteinkinase A
PP	Peroxisomenproliferator
PP2A	Protein-Phosphatase 2A
PPAR	Peroxisomenproliferator-Aktivierter-Rezeptor
PPRE	PPAR-responsives Element
PR	Progesteron-Rezeptor
PROD	7-Pentoxyresorufin-O-Depentylierung
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PXR	Pregnan-X-Rezeptor
ras	Ratten-Sarkomavirus G-Protein
RIA	<i>Radio-linked Immunoassay</i>
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SF-1	Steroidogener-Faktor-1
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SH2	Src-Homologie-Domäne 2
SHP	<i>small heterodimerisation partner</i> (kleiner Heterodimerisierungspartner)
SMRT	<i>silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors</i>
SRC	Steroidrezeptor-Coregulator
SULT	Sulfotransferase
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Stlsg.	Stammlösung

Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris-buffered salt solution</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TCPOBOP	1,4-bis[2-(3,5-Dichloropyridyloxy)]benzen
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TR	Thyroidhormon-Rezeptor
TRAP	Thyroidhormon-Rezeptor-assoziiertes Protein
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Tyk	Tyrosin-Kinase (Janus-Kinase)
U	Unit [$\mu\text{mol}/\text{min}$], internationale Einheit der Enzymaktivität
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
USF	<i>upstream regulatory factor</i> (aufwärts regulatorischer Faktor)
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
XRS	<i>xenochemical response sequence</i> (fremdstoffresponsive Sequenz)

E ZUSAMMENFASSUNG

Der Fettsäurestoffwechsel unterliegt vielfältigen Kontrollmechanismen. So wird der Fettsäureabbau über die Induktion und Aktivität spezifischer Enzyme reguliert. Ein zentraler Regulator ist dabei der nukleäre Rezeptor Peroxisomenproliferator-aktivierter-Rezeptor- α (PPAR α). PPAR α wird durch freie Fettsäuren in der Zelle aktiviert und fördert über die Induktion von Zielgenen den Fettsäuretransport und -abbau sowie die Gluconeogenese und Ketogenese. Der Anstieg an freien Fettsäuren beim Fasten, aber auch im Diabetes aktiviert PPAR α . Unabhängig davon wurde in beiden Stoffwechsellagen auch eine erhöhte Expression des nukleären Rezeptors Constitutiver-Androstan-Rezeptor (CAR) und einiger CAR-Zielgene, vorrangig Enzyme des Fremdstoffmetabolismus wie Cytochrom P450 2B (CYP2B), festgestellt. Bei der Adaption an eine Fastensituation scheinen PPAR α - und CAR-Signalwege über einen bisher unbekanntem Mechanismus miteinander verschaltet zu sein.

In der vorliegenden Arbeit sollte der der Verschaltung zugrunde liegende Mechanismus anhand eines Modellsystems, der PPAR α -Agonisten-vermittelten Verstärkung der Phenobarbital (PB)-abhängigen Induktion des CAR-Zielgens CYP2B, *in vitro* untersucht werden. Zudem sollte die physiologische Relevanz einer durch PPAR α -Agonisten vermittelten Modulierung der CYP2B-Aktivität in einer Ganztierstudie *in vivo* belegt werden.

Die verwendeten synthetischen PPAR α -Agonisten steigerten in primären Hepatozyten der Ratte signifikant die Phenobarbital (PB)-abhängige mRNA- und Protein-Expression sowie die Aktivität von CYP2B. Ohne vorherige PB-Behandlung induzierten PPAR α -Agonisten CYP2B nicht. In Gegenwart von PB war die Steigerung der CYP2B-Aktivität durch PPAR α -Agonisten dosisabhängig. In einem Luciferase-Reportergenassay wurde gezeigt, dass die Induktion durch PB unter der Kontrolle des CYP2B1-Promotors von einem distalen PBREM (*PB-responsive-enhancer-module*), an welches CAR binden kann, abhängig war. PPAR α -Agonisten steigerten diese PB- und PBREM-abhängige Reportergentranskription und induzierten die CAR-mRNA und CAR-Proteinexpression. Sie aktivierten die Transkription eines Reportergens unter der Kontrolle eines Promotorfragments von bis zu 4,4 kb oberhalb des mutmaßlichen CAR-Transkriptionsstarts. Mit Hilfe von Deletionskonstrukten konnte ein potentiell Peroxisomenproliferator-aktivierter-Rezeptor-responsives Element (PPRE) im CAR-Promotorbereich von -942 bp bis -930 bp identifiziert werden, welches essentiell für die Initiation der Transkription durch PPAR α -Agonisten ist. In *band shift* Experimenten akkumulierte verstärkt Kernprotein mit diesem PPRE. Ein Überschuss an unmarkiertem Wildtyp-CAR-Reportergenvektor, nicht aber an CAR-Reportergenvektor mit PPRE-Deletion, konnte mit dem markierten PPRE um die Bindung von Kernprotein konkurrieren. Nach Chromatin-Immunpräzipitation mit einem PPAR α -Antikörper wiederum wurde das betreffende PPRE amplifiziert.

Bei *in vivo* Experimenten an männlichen Ratten resultierte die Behandlung mit PPAR α -Agonisten in einer signifikanten Induktion der CAR-mRNA-Expression und signifikant erhöhter PB-abhängiger CYP2B-Aktivität. Die physiologische Relevanz wurde durch weiterführenden Experimente unterstrichen, in denen gezeigt wurde, dass die Fasten-abhängige Induktion von CAR in PPAR α -defizienten Mäusen unterdrückt war.

Diese Experimente legen nahe, dass durch PPAR α -Agonisten aktiviertes PPAR α an das PPRE im CAR-Promotorbereich von -942 bp bis -930 bp bindet und dadurch die CAR-Transkription induziert. Somit kann CAR als PPAR α -Zielgen betrachtet werden, was die Schlussfolgerung zulässt, dass die PPAR α - und CAR-Signalwege über die direkte Bindung von PPAR α an den CAR-Promotor unmittelbar miteinander verknüpft sind. Allerdings ist davon unabhängig eine Aktivierung von CAR, etwa durch PB, für die vermehrte Induktion von CAR-Zielgenen notwendig.

Die physiologische Relevanz der PPAR α -abhängige CAR-Expression zeigt sich in den Ganztierexperimenten, bei denen die Wirksamkeit der PPAR α -Agonisten bestätigt werden konnte. CAR-abhängig induzierte Enzyme sind nicht nur in großem Umfang am Fremdstoffmetabolismus beteiligt, sondern auch am Abbau von Schilddrüsenhormonen und Glucocorticoiden. Sie können damit direkt Einfluss auf den Kohlenhydrat- und Energiestoffwechsel sowie die Regulation der Nahrungsaufnahme nehmen. Über eine PPAR α -abhängige Induktion von CAR im Rahmen der Fastenadaptation könnten die CAR-Zielgene UDP-Glucuronyltransferase 1A1 und Sulfotransferase N beispielsweise verstärkt Schilddrüsenhormone abbauen und in der Folge den Grundumsatz senken. Der in dieser Arbeit erstmals beschriebene Mechanismus ist dafür von zentraler Bedeutung.

1 EINLEITUNG

1.1 Nukleäre Rezeptoren

Die transkriptionelle Regulation der Expression von Zielgenen durch Transkriptionsfaktoren erfolgt auf zwei unterschiedlichen Wegen. Hydrophile Liganden, z.B. Insulin, binden an membrangebundene Oberflächenrezeptoren und aktivieren über eine Kaskade von *second messengern*, die das Signal verstärken, Transkriptionsfaktoren. Lipophile Liganden können hingegen direkt im Zellinneren Transkriptionsfaktoren, sogenannte nukleäre Rezeptoren, aktivieren. Diese nukleären Rezeptoren (NR) bilden eine der größten Gruppen der Transkriptionsfaktoren bei Mehrzellern. Zu ihren Funktionen gehören die Regulation der Differenzierung, der Metamorphose, der Entwicklung, der Reproduktion, der Hormonbiosynthese und der Biotransformation. Für viele der zunächst mit dem Zusatz „*Orphan*“ versehenen Rezeptoren sind heutzutage synthetische und natürliche Liganden bekannt. Der NR-Signalweg führt über die Produktion (endokrin, parakrin, autokrin oder intrakrin) eines Signals (z.B. Hormone oder Fettsäuren), dessen Transport zur Zielzelle und Ligandbindung an den NR zu einer durch den nun aktiven Transkriptionsfaktor ausgelösten zellulären Antwort (Escriva, *et al.* 1997). Die Aktivität der Rezeptoren wird oft durch die Bindung von kleinen lipophilen Molekülen reguliert. Beispiele für solche Liganden sind Hormone, Fettsäuren, Gallensäuren, Oxysterole sowie Fremdstoffe wie Medikamente und Umweltgifte.

1.1.1 Die Nomenklatur der nukleären Rezeptoren

Die ersten NRs traten früh in der phylogenetischen Entwicklung der Metazoen (Mehrzeller) auf. Der Vergleich der stark konservierten DNA-Bindedomänen (DBD) und Ligand-Bindedomänen (LBD) ermöglichte eine Einteilung der Familie der nukleären Rezeptoren (NR) in sechs Subfamilien unterschiedlicher Größe (Amero, *et al.* 1992, Laudet 1997). Mitglieder der einzelnen Subfamilien, ihre Nomenklatur und Liganden sind in (Tab. 1) aufgeführt. Die Vielzahl der NRs entstand durch Genduplikation in zwei Wellen. Die erste Welle führte zur Herausbildung der sechs Subfamilien. Die zweite Welle trat spezifisch in Wirbeltieren auf und führte zur Entstehung von Subtypen. Die größten Subfamilien sind 1 bis 3. Subfamilie 1 enthält viele Rezeptoren, die in der Regel ein Heterodimer mit einem weiteren nukleären Rezeptor dem Retinoid-X-Rezeptor α (RXR α) bilden. Zur Subfamilie 2 gehören die HNF4- und RXR-Suptypen. In Subfamilie 3 befinden sich alle Steroidhormon-Rezeptoren (Escriva, *et al.* 2000, Germain, *et al.* 2006). Speziespezifisch treten von den einzelnen Suptypen Isoformen auf, die z.B. durch alternatives Spleißen entstehen.

Subfamilie	Isoformen	Nomenklatur	Ligand bzw. Aktivator
1	TR α und β	NR1A1 und 1A2	Schilddrüsenhormone
	PPAR α , β und γ	NR1C1, 1C2 und 1C3	ungesättigte Fettsäuren
	LXR α und β	NR1H3 und 1H2	Oxysterole
	FXR	NR1H4	Gallensäuren
	VDR	NR1I1	Vitamin D3
	PXR	NR1I2	Xenobiotika, PCN
	CAR	NR1I3	Bilirubin, Phenobarbital
2	HNF4 α und γ	NR2A1 und 2A2	Fettsäuren
	RXR α , β und γ	NR2B1, 2B2 und 2B3	9-cis-Retinsäure
3	ER	NR3A1	Östrogen
	GR	NR3C1	Dexamethason
	PR	NR3C3	Progesteron
	AR	NR3C4	Testosterone
4	NGF1-B	NR4A1	n.b.
5	SF-1	NR5A1	n.b.
6	GCNF1	NR6A1	n.b.

Tab. 1: Die Nomenklatur der nukleären Rezeptoren (Escriva, *et al.* 2000, Germain, *et al.* 2006)

TR= Thyroidhormon-Rezeptor, PPAR= Peroxisomenproliferator-aktivierter-Rezeptor, LXR= Leber-X-Rezeptor, FXR= Farnesoid-X-Rezeptor, VDR= Vitamin-D-Rezeptor, PXR= Pregnan-X-Rezeptor, CAR= Constitutiver-Androstan-Rezeptor, HNF4= Hepatischer-Nukleärer-Faktor-4, RXR= Retinoid-X-Rezeptor, ER= Östrogen-Rezeptor, GR= Glucocorticoid-Rezeptor, PR= Progesteron-Rezeptor, AR= Androgen-Rezeptor, NGF1-B = „*nerve growth factor induced clone B*“, SF-1= Steroidgener-Faktor-1, GCNF1= „*germ cell nuclear factor 1*“, n.b.= nicht bekannt

1.1.2 Die Struktur und die Funktion der nukleären Rezeptoren

Nukleäre Rezeptoren haben eine Modulstruktur bestehend aus einer ligand-unabhängigen AF-1 Transaktivierungsdomäne im N-terminalen Bereich, einer hochkonservierten DBD mit zwei Zinkfingern und einer LBD, die eine ligandenabhängige AF-2-Transaktivierungsdomäne in ihrem C-terminalen Bereich besitzt (Abb. 1)(Aranda und Pascual 2001). Zwischen der DBD und der LBD befindet sich eine variable Region (*hinge-region*), die Rotation erlaubt (Abb. 1)(Aranda und Pascual 2001). Wenige nukleäre Rezeptoren binden an ihre responsiven Elemente als Monomer, die meisten bilden zuvor entweder Homodimere oder Heterodimere mit dem nukleären Rezeptor RXR α (NR2B1). Zu den Rezeptoren, die Homodimere bilden, gehören die Steroidhormon-Rezeptoren wie der Androgen- und der Progesteron-Rezeptor (AR und PR) und der Glucocorticoid-Rezeptor (GR) sowie RXR α selbst. Zu den Rezeptoren,

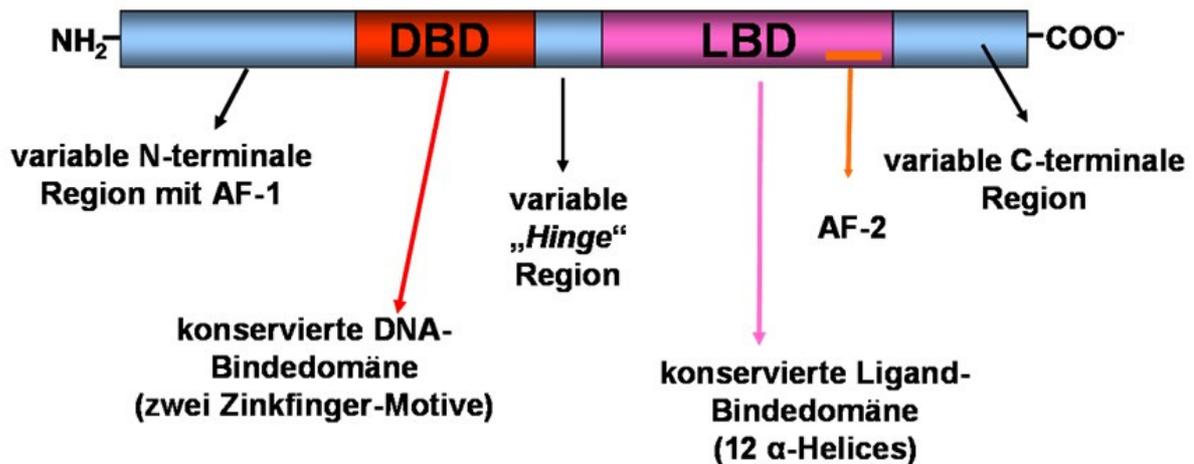


Abb. 1: Die Modulstruktur nukleärer Rezeptoren

Nukleäre Rezeptoren sind nach einer festen Modulstruktur aufgebaut. Sie besitzen eine variable N-terminale Region, gefolgt von einer hochkonservierten DNA-Bindedomäne. Diese besteht aus zwei Zinkfinger-Motiven (rot), einer Rotation erlaubenden, variablen „Hinge“-Region, einer aus 12 α -Helices aufgebauten Ligandbindedomäne (pink) und einem variablen C-terminalen Ende.

die Heterodimere mit RXR α bilden, gehören z.B. der Constitutive-Androstan-Rezeptor (CAR), der Pregnane-X-Rezeptor (PXR), der Leber-X-Rezeptor (LXR), der Farnesoid-X-Rezeptor (FXR), der Vitamin-D-Rezeptor (VDR), der Thyroidhormon-Rezeptor (TR) und der Peroxisomenproliferator-aktivierte-Rezeptor (PPAR) (Germain, *et al.* 2006). Einige nukleäre Rezeptoren wie TR verhindern Transkription in Abwesenheit eines Liganden (Apo-Rezeptor) durch Bindung von so genannten Corepressoren. Man unterscheidet permissive und nicht-permissive Heterodimere. Permissive Heterodimere, wie z.B. PPAR:RXR oder RXR:LXR, können im Gegensatz zu nicht-permissiven wie RXR:VDR auch durch Liganden von RXR α aktiviert werden (Desvergne und Wahli 1999, Kliewer, *et al.* 1992). Ligandbindung zu einem oder beiden Partnern führt zur Bindung von Cofaktoren und stabilisiert in der Regel den Heterodimer-Komplex. Die Strukturen der DNA und Ligand-Bindedomänen sind entscheidend für die Art der Dimerbildung, DNA- bzw. Ligand-Erkennung.

Die DNA-Bindedomäne (DBD): Die zentrale DBD ist für die Erkennung des spezifischen responsiven DNA-Elements durch den Rezeptor und die Dimerisierung mit dem zweiten NR zuständig (Kumar, *et al.* 1986). Sie besitzt ein Typ-II-Zinkfinger-Motiv (Abb. 2), welches aus zwei Subdomänen besteht. Jede enthält ein vier Cysteine koordinierendes Zinkion, gefolgt von einer α -Helix. An die Subdomänen schließt sich eine COOH-terminale Verlängerung (*C-terminal extension*, CTE) an (Luisi, *et al.* 1991, Schwabe, *et al.* 1993). Die DBD bindet meist als Dimer, wobei jedes Monomer, also jede DBD, eine hexamere DNA-Sequenz erkennt. Die erste α -Helix enthält zwischen den letzten beiden Cysteinen die sogenannte P-Box (Abb. 2),

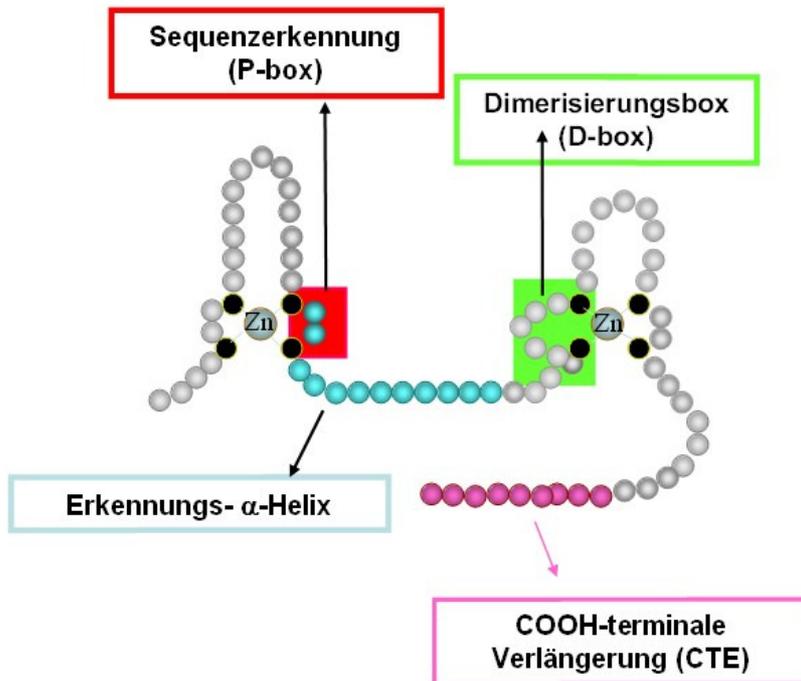


Abb. 2: Die DNA-Bindedomäne (DBD) nukleärer Rezeptoren

Die DBD besitzt ein Typ II Zinkfinger-Motiv und eine COOH-terminale Verlängerung (pink). Das Zinkfingermotiv besteht aus zwei Subdomänen, von denen jedes ein 4 Cysteine (schwarz) koordinierendes Zinkion, gefolgt von einer α -Helix (blau), enthält. Durch die DBD erkennt der Rezeptor mittels der P-Box (rot) die Sequenz spezifischer responsiver DNA-Elemente und koordiniert über die D-Box (grün) im zweiten Zinkfinger die Dimerisierung mit dem zweiten NR.

die für die Unterscheidung der responsiven Elemente unabdingbar ist (Laudet 1997). Elemente im zweiten Zinkfinger, D-Box genannt (Abb. 2), sind entscheidend für die Dimerisierung mit dem zweiten NR. Beide Helices kreuzen im rechten Winkel und können sich so in der großen Grube der DNA-Doppelhelix an die responsiven Elemente anlagern (Umesono und Evans 1989). Der Abstand und die Orientierung zweier solcher hexameren Kernmotive bestimmt, welcher NR bindet. Homodimere der Steroidhormon-Rezeptoren binden vornehmlich an die Abfolge zweier hexamerer Palindromsequenzen des Typs 5'-AGAACA-3', die durch 3 Basenpaare (*inverted repeat*, IR3) getrennt sind. Eine Ausnahme bildet der Östrogen Rezeptor (ER), welcher Palindrome der Konsensussequenz 5'-AGGTCA-3' erkennt. Steroidhormon-Rezeptoren dimerisieren in einer „*head to head*“-Anordnung (Luisi, *et al.* 1991, Schwabe, *et al.* 1993). Fast alle anderen nukleären Rezeptoren erkennen ein oder zwei Kopien der Konsensussequenz 5'-AGGTCA-3', darunter diejenigen, die Heterodimere mit RXR α bilden. Sie binden als Dimer in einer „*head to tail*“-Anordnung an direkte Abfolgen von zweien dieser Kernmotive, die durch 1 bis 5 Basenpaare (*direct repeat*, DR1-5) getrennt sind (Rastinejad, *et al.* 1995). Die DBD kann durch Phosphorylierung, Ubiquitylierung oder auch SUMOylierung posttranslational modifiziert, und damit die nukleäre Lokalisation des NR verändert werden.

Die Ligand-Bindedomäne (LBD): Die dreidimensionale Struktur der LBD (Abb. 3) besteht aus einer dreilagigen, antiparallelen, sandwichartigen Anordnung von 12 α -Helices, die eine hydrophobe Tasche bilden (Bourguet, *et al.* 2000, Bourguet, *et al.* 1995). Diese Helices formen vier strukturell unterschiedliche, aber funktionell verknüpfte Oberflächen: eine Dimerisierungsstruktur, welche die Interaktion mit der Partner-LBD lenkt, eine variable hydrophobe Ligandbindungstasche (LBP), welche mit dem lipophilen Liganden interagiert, eine Oberfläche, die die Coregulatoren bindet und eine AF-2 Aktivierungshelix, welche die ligandenabhängige Transaktivierung vermittelt (Germain, *et al.* 2002). Die Bindung des Liganden in der LBP ist von sehr großer Bedeutung für die Initiation der Aktivierung von NRs. Die LBP liegt normalerweise hinter Helix 3 und vor Helix 7 und 10 und ist mit vornehmlich hydrophoben Aminosäuren ausgekleidet. Einige polare Reste in der Tiefe der Tasche fungieren als Anker für den Liganden bzw. sorgen für die richtige Orientierung und die Spezifität der LBP. Auch die Form und Größe der LBP definieren die Spezifität und variieren stark zwischen den einzelnen Rezeptoren. Die Ligand-Bindung (Holo-Rezeptor) verursacht eine Änderung der Konformation von Helix 12, die es der AF-2-Domäne in Helix 12 ermöglicht Coregulatoren zu rekrutieren. Die Coregulatoren modifizieren die Acetylierung des Chromatins und forcieren oder hemmen die Bindung der Transkriptionsmaschinerie (Bourguet, *et al.* 1995). Eine entgegengesetzte Art der Regulation wurde bei CAR beobachtet. Der Rezeptor bindet in der Apo-Form Coaktivatoren wie den Steroidrezeptor-Coregulator-1 (SRC-1) aus der p160-Familie und reprimiert nach Bindung von z.B. Androstenol in der Holo-Form die Transkriptionsaktivität (Muangmoonchai, *et al.* 2001, Ueda, *et al.* 2002a). Nicht zuletzt spielt auch die Lokalisation des Rezeptors eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der Transkription. Neben einigen nukleären Rezeptoren (RXR, PPAR), die sowohl in der Apo- als auch in der Holo-Form im Zellkern an die DNA gebunden sind, sind die Steroidhormon-Rezeptoren, aber auch CAR über die LBD als Komplex mit HSP90 (*heat shock protein 90*) im Cytosol lokalisiert (Pratt und Toft 1997, Yoshinari, *et al.* 2003). Im ersten Fall führt die Ligandbindung zur Dissoziation von Corepressoren und zur Rekrutierung von Coaktivatoren und der Induktion der Transkription. Im zweiten Fall initiiert die Ligandbindung oder die Aktivierung die Translokation des Rezeptors in den Nukleus und induziert damit die Transkription (Nettles und Greene 2005, Roeder 2005, Yoshinari, *et al.* 2003). Die Bewegung von Proteinen zwischen Cytosol und Zellkern ist ein Energie-abhängiger Prozess, der in der Regel durch die nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) und die nukleäre Exportsequenz auf dem Protein determiniert wird. Ein typisches NLS-Signal besteht aus einem oder mehreren Clustern von basischen Aminosäuren, die mit Faktoren wie Importin assoziieren, welche das Protein mittels Dynein-Motoren durch die Kernporen in den Zellkern transportieren. Eine klassische Exportsequenz ist eine Leucin-reiche Region. Die C-terminale AF-2-Domäne ist bei Rezeptoren, die sich im Cytosol befinden und durch Ligandbindung aktiviert werden,

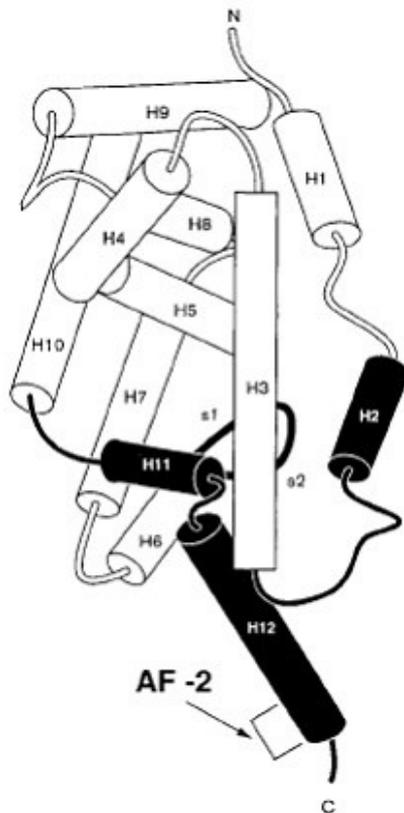


Abb. 3: Die Ligand-Bindedomäne (LBD) nukleärer Rezeptoren (Aranda und Pascual 2001)

Dargestellt ist die LBD von RXR α ohne Ligandbindung. Die dreilagige, antiparallele, sandwichartige Anordnung der 12 α -Helices bildet eine hydrophobe Ligandbindungstasche (LBP). Nach Ligandbindung ändert sich die Konformation von Helix 12, so dass die AF-2-Domäne Co-Faktoren binden kann.

entscheidend für die Translokation in den Zellkern. Die AF-2-Domäne von CAR ist wesentlich kürzer als die anderer NRs. Für die Translokation von CAR, jedoch nicht die Bindung von Cofaktoren, ist eine so genannte Leucin-reiche Fremdstoff-responsive Sequenz (XRS-*xenochemical response sequence*) mit dem zwischen Mäusen und Menschen konservierten Motiv (L/ M)XXLXXL notwendig (Guo, *et al.* 2006, Jia, *et al.* 2004).

1.1.3 Die Coregulatoren von nukleären Rezeptoren

Die Organisation der DNA zu Chromatin im Genom von Eukaryoten führt zu einem regulatorischen Hindernis, dessen Überwindung für viele zelluläre Prozesse entscheidend ist. (Khorasanizadeh 2004). Die Chromatinstruktur limitiert den Zugang der Transkriptionsmaschinerie zu den Promotorsequenzen und organisiert damit die genomische Information (Perkins, *et al.* 2004). Die Histone der aktiven Chromatinregionen des Euchromatins weisen Hyperacetylierung auf, wohingegen die Histone der transkriptionell inaktiven Regionen des Heterochromatins hypoacetyliert sind. Viele der Veränderungen in der

Chromatinstruktur durch Transkriptionsfaktoren beinhalten Histonmodifizierungen durch Enzyme wie Histon-Acetyltransferasen (HATs), -Methyltransferasen oder Kinasen und führen zu einer spezifischen Transkriptionsantwort und spezifischen Zellfunktionen. NRs rekrutieren Cofaktoren, deren enzymatische Aktivität gezielt Histone modifiziert. Diese Cofaktoren werden nicht ausschließlich von NRs, sondern universal verwendet. Coaktivatoren besitzen meist ein LxxLL-NR-Box Motiv, über das sie an die AF-2-Domäne der LBD des NRs binden. Die Rekrutierung von HATs oder die intrinsische HAT-Aktivität führt zur Hyperacetylierung und zur Anheftung des RNA-Polymerase-II-Holoenzym. Als Beispiele für Cofaktoren mit intrinsischer HAT-Aktivität lassen sich die p160-Familie (die SRCs) und das cAMP-responsive-Element-Bindeprotein (CBP) benennen. Der Thyroidhormon-Rezeptor-assoziierte-Protein (TRAP) – Vitamin-D-Rezeptor-interagierendes-Protein (DRIP) Komplex besitzt selbst keine HAT-Aktivität, kann HATs aber zum NR-Cofaktor-Komplex rekrutieren (DiRenzo, *et al.* 1997). Im Gegenzug führen Corepressoren wie SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*) zur Rekrutierung von Histon-Deacetylasen, die die Kondensierung der DNA fördern. SHP (*small heterodimer partner*) gehört zur Gruppe der NR-verwandten Proteine und besitzt nur eine LBD, jedoch keine DBD. Er fungiert als inhibitorischer Partner für viele NRs, indem er über LxxLL-Motive an die AF-2-Domäne bindet. Somit verhindert er z.B. bei der Regulation des Gallensäurestoffwechsel in einer Art Rückkopplungsmechanismus sowohl die Heterodimerisierung als auch die Bindung von Coaktivatoren an LXR oder HNF4 α (Eloranta und Kullak-Ublick 2005, Francis, *et al.* 2003, Wang, *et al.* 2002).

1.1.4 Die Phasen der Biotransformation und die Rolle nukleärer Rezeptoren

Hydrophobe, nicht-reaktive Xeno- und Endobiotika müssen in eine hydrophile Form umgewandelt werden, bevor sie vom Körper ausgeschieden und damit unschädlich gemacht werden können. Die Biotransformation dieser Stoffe wird meist von Cytochromen P450 (CYP450) eingeleitet. CYP450 sind intrazelluläre, membrangebundene Hämoproteine, die molekularen Sauerstoff aktivieren und damit funktionelle Gruppen in das sonst wenig reaktive Substrat einfügen. Da CYPs nach Begasung mit Kohlenmonoxid im reduzierten Zustand ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 450 nm aufweisen, werden sie P450 genannt (Omura, *et al.* 1965). In der Nomenklatur unterteilt man CYP450 aufgrund identischer Aminosäuresequenz in Genfamilien (40%), Subfamilien (55%) und Isoformen (Nebert, *et al.* 1987). Die CYP-Familien 1 bis 4 werden in der Leber exprimiert und sind maßgeblich am Fremdstoffmetabolismus und dem Metabolismus endogener lipophiler Substanzen beteiligt. Darüber hinaus wirken CYP450 an der Biosynthese von Thromboxanen und Prostaglandinen aus Arachidonsäure (CYP5 und 8) und an der Biosynthese von Steroidhormonen (CYP11, 17, 19 und 21), Gallensäuren und Vitamin D3 (CYP7, 24 und 27) aus Cholesterol mit.

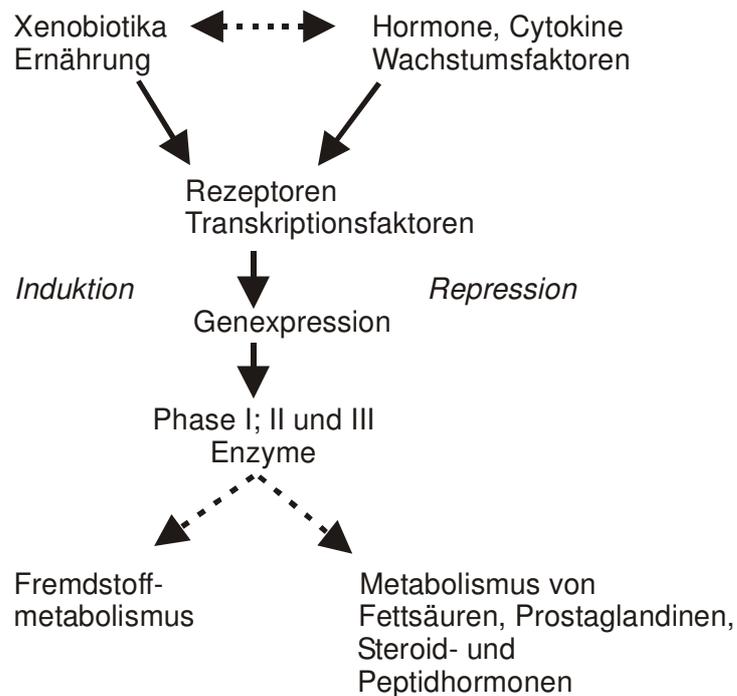


Abb. 4: Die Wechselwirkungen zwischen Fremdstoffen und endogenen Regulationswegen (Waxman 1999)

Hormone, Cytokine, Wachstumsfaktoren, Xenobiotika sowie die Ernährungsweise beeinflussen die Genexpression von Enzymen der Phasen I; II und III der Biotransformation direkt und durch das Zusammenspiel untereinander. Daraus resultiert ein verändertes Expressionsmuster. CYP450-abhängige Reaktionen, wie die Metabolisierung von Fremdstoffen und die endogene Synthese von Steroidhormonen, Prostaglandinen und Fettsäuren, die nachfolgende Konjugierung und der Export werden moduliert.

CYP450 befinden sich vornehmlich in der Membran des endoplasmatischen Retikulums, aber auch in der inneren Mitochondrienmembran. In Anwesenheit eines Substrates und molekularen Sauerstoffs werden zwei Elektronen des NADPH mittels eines Flavoproteins auf das Hämoprotein übertragen. Das Substrat wird oxidiert und ein Atom Sauerstoff eingebaut, wodurch während CYP450 abhängiger Reaktionen reaktive Sauerstoffspezies entstehen und wiederum zelltoxisch wirken können. Die durch Phase-I-Enzyme eingeführten funktionellen Gruppen ermöglichen Phase-II-Enzymen die Konjugation von polaren Resten. Das Substrat wird dadurch in eine hydrophile Form umgewandelt. Neben diesem gewünschten Effekt kann die Einführung reaktiver Gruppen durch CYP450, aber auch die Bildung von hochreaktiven, toxischen oder mutagenen Substanzen aus nicht-reaktiven, unschädlichen Verbindungen begünstigen. Zur Klasse der Phase-II-Enzyme gehören z.B. die Uridinphosphat-Glucuronosyltransferasen (UGT), die Sulfotransferasen (SULT) und die Gluthation-S-Transferasen (GST). Das nun hydrophile Substrat wird durch Transporter der Phase-III aus der Zelle ausgeschleust und abhängig vom Molekulargewicht entweder mit der Faeces oder dem Urin ausgeschieden. CYP450, UGTs, SULTs, GSTs und Transporter werden durch die Aktivierung nukleärer Rezeptoren wie CAR, PPAR α , PXR, LXR, FXR und HNF4 α gewebespezifisch exprimiert. Jeder Rezeptor weist strukturelle Besonderheiten auf, die es ihm

ermöglichen, die Expression bestimmter Gene und somit gezielt Stoffwechselprozesse zu regulieren. Schlüsselenzyme, die Schnittstellen zwischen verschiedenen Stoffwechselprozessen darstellen, werden häufig durch mehrere nukleäre Rezeptoren reguliert. CYP7A1, das Schlüsselenzym am Beginn der Gallensäuresynthese, katalysiert die Bildung von 7 α -Hydroxycholesterol aus Cholesterol und wird durch LXR und FXR positiv bzw. negativ reguliert. Das dichte Netzwerk nukleärer Rezeptoren sichert die Steuerung der Biotransformation in der Leber und koordiniert damit nicht nur den Fremdstoffmetabolismus, sondern auch den Lipid- und Hormonstoffwechsel. Die Expression kann neben endogenen Hormonen auch durch diverse Fremdstoffe induziert und durch Cytokine moduliert werden (Abb. 4). Die Pharmakokinetik und damit die Wirksamkeit von Medikamenten kann verändert, die Toxizität und Kanzerogenität von Xenobiotika erhöht werden (Conney 1982).

1.2 Der Constitutive-Androstan-Rezeptor (CAR)

1.2.1 Das Vorkommen und die Funktion von CAR

1994 wurde, zunächst in humaner (Baes, *et al.* 1994) und später auch in muriner Leber (Choi, *et al.* 1997), ein nukleärer Rezeptor entdeckt, der mit RXR α heterodimerisiert. Da dieser nukleäre Rezeptor zum einen konstitutiv aktiv war und zum anderen diese Aktivität durch Ligandbindung von endogenem Androstenol oder Androstanol gehemmt werden konnte (Forman, *et al.* 1998), wurde er *constitutive-(active)-androstane-receptor* genannt. Die konstitutive Aktivität wird durch van der Waals Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Helix 12 und der LBD, besonders Tyrosin 326, erzeugt, die seine auffällig kurze Helix 12 in der aktiven Position halten. Stabilisiert durch aliphatische und aromatische Aminosäurereste und eine Wasserstoffbrücke mit N165, zeigt Y326 permanenten Kontakt mit Helix 12, wie er bei anderen nukleären Rezeptoren nur nach Ligandbindung beobachtet wird (Windshugel, *et al.* 2007). Auch die RXR α -Dimerisierungsoberfläche ist bei CAR sehr viel größer als bei anderen nukleären Rezeptoren und könnte die RXR α :CAR-Dimerbildung favorisieren (Suino, *et al.* 2004). Das RXR α :CAR-Heterodimer bindet bevorzugt an DR4-Motive (Honkakoski, *et al.* 1998, Sueyoshi und Negishi 2001). Gebunden in einem Komplex aus dem cytoplasmatischen-CAR-Retentionsprotein (CCRP) und HSP90, befindet sich murines CAR ähnlich wie die Steroidhormon-Rezeptoren, im inaktiven Zustand im Cytoplasma (Yoshinari, *et al.* 2003). Als Antwort auf Phenobarbital-Stimulation kommt es über die Rekrutierung von Proteinphosphatase 2A zur Dephosphorylierung und dem Zerfall dieses Komplexes und damit zur Translokation von CAR in den Zellkern (Kawamoto, *et al.* 1999, Yoshinari, *et al.* 2003). Dabei spielen die leucinreiche Bereiche (L313, 316 und 319 in humanem CAR) in der Nähe des C-Terminus im humanen und Serin 202 im murinen CAR eine große Rolle (Hosseinpour, *et al.* 2006, Squires, *et al.* 2004, Zelko, *et al.* 2001). In Mäusen

ist der Cofaktor PPAR-Bindeprotein (PBP, auch bekannt als TRAP220/ DRIP205/MED1) essentiell für die CAR-Translokation und/ oder -Retention im Zellkern nach Stimulation mit TCPOBOP (Guo, *et al.* 2006). GRIP-1 scheint für die PB-abhängige Translokation in den Zellkern von Bedeutung zu sein (Min, *et al.* 2002). Im Zellkern heterodimerisiert CAR nach weiteren Ca^{2+} / Calmodulin-Kinase abhängigen Phosphorylierungsschritten mit RXR α und induziert Zielgene (Yoshinari, *et al.* 2003). Die Initiation der Translokation von CAR in den Zellkern, nicht die Ligandbindung, ist der entscheidende Schritt bei der CAR-abhängigen Transkription von Zielgenen.

Wildtyp-CAR besteht aus 358 Aminosäuren. Das Gen ist aus neun Exons aufgebaut und bei Ratten auf Chromosom 13 lokalisiert. CAR tritt bei Nagern als auch beim Menschen in Spleißvarianten auf, in Leber von Ratten existieren neben dem Wildtyp-CAR fünf verkürzte Spleißvarianten, denen das LxxLL-Motiv zur Cofaktorrekutierung fehlt (Auerbach, *et al.* 2005, Auerbach, *et al.* 2003, Kanno, *et al.* 2005, Lamba, *et al.* 2004). CAR und/oder CAR-Spleißvarianten werden beim Mensch und der Maus im geringen Maße auch im Herz, dem Muskel, dem Gehirn, der Niere und der Lunge exprimiert (Swales und Negishi 2004).

1.2.2 Die Regulation der CAR-Expression

Die Funktion von CAR wird nicht nur durch die Veränderung der phosphorylierungssensitiven CAR-Translokation, sondern auch durch die Kompetition um Cofaktoren bzw. den Heterodimerisierungspartner RXR α , die Affinität zu responsiven DNA-Elementen sowie die Stärke der CAR-Expression beeinflusst. So ist von Cytokinen und Glucocorticoiden bekannt, dass sie die CAR-Expression hemmen bzw. fördern (Abdelrazzak, *et al.* 1995, Assenat, *et al.* 2004, Beigneux, *et al.* 2002, Clark, *et al.* 1996, Pascussi, *et al.* 2000). Endotoxin-stimulierte Relokalisation von RXR α in das Cytosol in der Akutphase könnte die RXR α -Heterodimerbildung mit CAR oder möglichen CAR-induzierenden NRs beeinträchtigen und dadurch sowohl die CAR-Aktivität als auch die CAR-Expression hemmen (Ghose, *et al.* 2004). Nachdem beobachtet wurde, dass die Behandlung mit dem Glucocorticoid Dexamethason die CAR-Expression in primär kultivierten Hepatozyten erheblich verbesserte, konnten Pascussi *et al.* ein funktionales Glucocorticoid-responsives-Element (GRE) im humanen CAR-Promotorbereich von -4447 bp bis -4432 bp oberhalb des mutmaßlichen Transkriptionsstarts identifizieren. Zudem fanden Ding *et al.* ein funktionales HNF4 α -RE im proximalen CAR-Promotor von Mensch und Maus (-107 bp bis -93 bp bzw. -19 bp bis -5 bp). Da schon zuvor bei der Maus eine erhöhte CAR-Expression beobachtet werden konnte, postulierten sie, dass ein cAMP-Anstieg im Fasten cAMP-responsives-Element-Bindeprotein-abhängig die Expression des PPAR γ -Coaktivators-1 α (PGC1 α) induziert. In ihren Experimenten aktivierte der Cofaktor PGC1 α dann gemeinsam mit HNF4 α über die Bindung an das proximale HNF4 α -RE im CAR-Promotor die Transkription von CAR (Ding, *et al.* 2006). Aktiviertes CAR konnte wiederum mit HNF4 α um gemeinsame Cofaktoren (PGC1 α und GRIP-1) konkurrieren und

dadurch die HNF4 α -Transkriptionseffizienz hemmen (Miao, *et al.* 2006). Da auch CAR ein HNF4 α -Zielgen ist, könnte dies eine Art Autoregulation darstellen.

1.2.3 Aktivatoren und Zielgene von CAR

Der klassische Aktivator von CAR-Zielgenen ist das Barbiturat Phenobarbital (PB). Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* hat die Behandlung mit PB einen pleiotropen Effekt auf Hepatozyten. Die PB-Injektion in Ratten führt in der Leber zur Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums, zur Steigerung der Lebermasse, zur Tumorpromotion und zu einer generellen Induktion vieler fremdstoffmetabolisierender Enzyme (Yamamoto, *et al.* 2004). Induziert werden vor allem die Phase-I-Enzyme CYP2B1 (50- bis 100-fach), CYP2C6 und CYP3A4 (2- bis 4-fach), die Phase-II-Enzyme Aldehyd-Dehydrogenase 1, GST1A1, SULTN, UGT1A1, UGT2B1 sowie die Phase-III-Enzyme MRP 1-3 (Maglich, *et al.* 2002, Maglich, *et al.* 2004, Waxman und Azaroff 1992), aber auch δ -Aminolävulinatsynthase-1 (ALAS-1), die für den Aufbau des Häm-Gerüsts von Hämoproteinen, wie z.B. CYP2B1, notwendig ist (Sinclair, *et al.* 1990, Varone, *et al.* 1999). Mit Hilfe von CAR(-/-)-Mäusen konnte gezeigt werden, dass viele jedoch nicht alle PB-responsiven Gene CAR-abhängig induziert werden (Honkakoski, *et al.* 2003, Kakizaki, *et al.* 2003, Maglich, *et al.* 2002, Ueda, *et al.* 2002b, Wei, *et al.* 2000). Es wurde zwar in den CAR(-/-)-Mäusen nach PB-Behandlung weiterhin die ALAS1 exprimiert, dagegen keine CYP2B1-Expression mehr nachgewiesen (Kakizaki, *et al.* 2003). Die durch CAR aktivierten responsiven Elemente der DNA (DR4-Motive) in diesen Genen wurden PBREM (*phenobarbital responsive enhancer module*) genannt (Corcos und Lagadic-Gossmann 2001). Neben PB entdeckte man noch weitere PB-ähnliche Induktoren von CAR-Zielgenen, wie Permethrin, Phenytoin, Dichlorodiphenyltrichloroethan (DDT), 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen (TCPOBOP, nur bei Mäusen), polychlorierte Biphenyle, aber auch Bilirubin, ein Endprodukt des oxidativen Häm-Abbaus (D. Bauer, *et al.* 2004, Huang, *et al.* 2003, Jemnitz, *et al.* 2002, Swales und Negishi 2004, Wang, *et al.* 2004, Wei, *et al.* 2000, Wyde, *et al.* 2003).

Da viele dieser Substanzen Fremdstoffe sind, wurde CAR lange Zeit, wie sein naher Verwandter PXR, fast ausschließlich als Xenosensor betrachtet. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit aktivieren PXR und CAR ein überlappendes Set an Zielgenen (Honkakoski, *et al.* 2003, Pascussi, *et al.* 2001, Sueyoshi, *et al.* 1999, Xie, *et al.* 2003). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass CAR auch eine endokrine Funktion hat (Handschin und Meyer 2005).

Nach Langzeitbehandlung von Ratten mit PB, dem klassischen Aktivator von CAR, wurden ein Anstieg des Serumcholesterols, gestörte Glycolyse und vermehrte Lipolyse beobachtet (Kiyosawa, *et al.* 2004). Triacylglycerole wurden aufgrund gesteigerter Lipoproteinlipaseaktivität vermehrt zu Acetyl-CoA abgebaut und verstärkt Cholesterolsynthetisiert, da das Acetyl-CoA weder in den Citratzyklus (Oxalacetat fehlt) noch in die Ketonkörpersynthese (HMG-CoA-Synthese gehemmt) eingeschleust werden konnte

(Kiyosawa, *et al.* 2004). Männliche Tiere, die lange Zeit mit PB behandelt wurden, zeigten außerdem einen gestörten Steroidmetabolismus, der sich in Entwicklungsstörungen und Feminisierung manifestierte (Elias und Gwinup 1980, Rosenbrock, *et al.* 1999). Pränatale Exposition mit PB-ähnlichen Aktivatoren führte zu einem erhöhten Risiko gestörter Geschlechtsentwicklung beim Fötus (Johri, *et al.* 2006, Meyer, *et al.* 2006).

Chronische Anhäufung von Bilirubin im Körper ist begleitet von Ikterus. Bilirubin wirkt neurotoxisch und kann zu Enzephalopathie führen. In Hepatozyten glucuronidiert UGT1A1 Bilirubin, welches dann durch den Transporter MRP2 (*multidrug resistant related protein 2*) in den Gallengang exportiert wird (Jemnitz, *et al.* 2002). Es ist lange bekannt, dass PB den Bilirubinspiegel senken kann. Sowohl die UGT1A1- als auch MRP2-Expression kann durch CAR induziert werden. Nicht nur Bilirubin, sondern auch ein hoher Gallensäurespiegel aktiviert CAR. CAR induziert dann Zielgene, die zur Hydroxylierung, Sulfatierung und dem Export der Gallensäuren führen.

Während des Fastens kommt es ebenfalls zu erhöhter Expression von CAR. CAR-abhängig induzierte UGT1A1 oder SULTN sind auch am Abbau des Schilddrüsenhormons T4 (Thyroxin) beteiligt (Vansell und Klaassen 2002). Daher führt die CAR-Induktion über eine Reduktion der Schilddrüsenhormone auch zu einer Verringerung des Grundumsatzes (Maglich, *et al.* 2004, Qatanani, *et al.* 2005).

1.2.4 Das CAR-Zielgen Cytochrom P450 2B1

Cytochrome P450 2B1 und 2B2 sind die am besten untersuchten CYP450 der Ratte. Sie werden in der Leber stärker exprimiert als in extrahepatischem Gewebe. CYP2B1 und CYP2B2 unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz in nur 14 von 491 Aminosäuren (97 % identisch) und sind deshalb immunochemisch schwer zu unterscheiden (Suwa, *et al.* 1985). CYP2B2 ist weitaus weniger katalytisch aktiv als CYP2B1 (Ryan, *et al.* 1982). Wie sein humanes Homolog CYP2B6 kann CYP2B1 CAR-abhängig durch Phenobarbital induziert werden. Der RXR α :CAR-Komplex bindet an ein 51 bp DNA-DR4-Motiv der Sequenz AGGTCA im CYP2B1-Promotor. Die Bindungssequenz des CAR ist zwischen Ratten, Mäusen und Menschen hoch konserviert (Kakizaki, *et al.* 2003) und enthält zwei nukleärer-Rezeptor-Bindungsstellen (NR1 und NR2). Im humanen Homolog CYP2B6 wurde ein Okadainsäure-responsives Element (OARE) im proximalen Promotor (-256 bp bis -233 bp) und ein distales CAR bzw. PXR-bindendes Verstärkermodul (-8597 bis -8495 bp) entdeckt (Swales, *et al.* 2005, Wang, *et al.* 2003). Zum einen sind CYP2B-Isoformen an der Aktivierung von nahezu 25 % der heutigen Arzneimittel, wie z.B. die Chemotherapeutika Cyclophosphamid und Tamoxifen, oder das Anesthetikum Ketamin beteiligt (Wang, *et al.* 2003), zum anderen werden Aflatoxin B1, Kokain oder Acetaminophen zu geno- bzw. hepatotoxischen Metaboliten umgewandelt (Code, *et al.* 1997).

1.3 Der Peroxisomenproliferator-aktivierte-Rezeptor-alpha (PPAR α)

PPARs kontrollieren eine Vielzahl von Genen des Lipidmetabolismus, z.B. den Fettsäuretransport, die Fettsäureaufnahme in die Zellen, die intrazelluläre Bindung und Aktivierung der Fettsäuren ebenso wie den Fettsäure-Katabolismus, bestehend aus β - und ω -Oxidation, und die Fettspeicherung. Sie werden nicht nur durch Fettsäuren sondern auch durch Fibrate oder Eicosanoide aktiviert. Jeder PPAR-Subtyp aktiviert spezieabhängig Gene spezifischer Signalwege, die die minutiöse Regulation der Lipidhomeostase koordinieren. Von den drei bekannten PPAR-Subtypen PPAR α , β/δ und γ ist PPAR α die prädominante Form in der Leber.

1.3.1 Das Vorkommen und die Funktion von PPAR α

Nach langer Behandlung mit Fibraten wurde bei Nagern eine erhöhte Peroxisomenproliferation beobachtet und daher der verantwortliche Rezeptor Peroxisomenproliferator-aktivierter-Rezeptor genannt. PPAR α kommt neben der Leber auch in relativ großer Menge in den Nieren, dem Herz, der Darmmucosa, der quergestreiften Muskulatur und dem braunen Fettgewebe vor. Die Retina, die Nebennieren und der Pankreas exprimieren ebenfalls geringe Mengen an PPAR α . Im Gegensatz zu Nagern kommt es in der Leber von Menschen durch Behandlung mit PPAR α -Agonisten nicht zu Peroxisomenproliferation und Tumorpromotion, wahrscheinlich da Menschen hier weitaus geringere Mengen an PPAR α exprimieren als Nager (Lee, *et al.* 1995, Palmer, *et al.* 1998). PPAR α ist im Zellkern lokalisiert und bildet schon vor der Ligandbindung Heterodimere mit RXR α (Feige, *et al.* 2005, Wan, *et al.* 2000). PPAR α :RXR α bindet bevorzugt an DR1-Motive, auch Peroxisomenproliferator-responsives Element (PPRE) genannt, die sich im Promotorbereich von Zielgenen befinden (Gearing, *et al.* 1993, Keller, *et al.* 1993, Kliewer, *et al.* 1992). Die Konsensus-Sequenz der PPREs unterscheidet sich jedoch von DR1-Motiven, die von anderen Rezeptoren wie dem TR erkannt werden. Sie besteht aus einer verlängerten 5'-Halbbindestelle, einem imperfekten DR1-Motiv und einem Adenin als Base zwischen den Hexameren (PPRE: 5'-aact AGGNCA a AGGTCA-3'). Diese PPRE-Struktur mit der 5'-Verlängerung führt zu einer Polarisierung des gebundenen Heterodimers. Im Gegensatz zu anderen NRs der Subfamilie 1 bindet PPAR α an das 5'-gelegene Hexamer, wohingegen RXR das 3'-gelegene Hexamer besetzt (DiRenzo, *et al.* 1997, Ijpenberg, *et al.* 1997). Die 5'-Verlängerung (5'-aact-3') des PPREs interagiert mit der CTE (C-terminale Extension) des zweiten Zinkfingers von PPAR α . Diese ist somit für die PPRE-Erkennung und die Bindungsaffinität von PPARs an PPREs von Bedeutung (Hsu, *et al.* 1998). Für die Heterodimerisierung mit RXR α sind hauptsächlich Leucine in Helix 10 und die AF-2 in Helix 12 verantwortlich.

1.3.2 Die Regulation der PPAR α -Expression

In der Rattenleber regulieren Insulin und Glucocorticoide PPAR α negativ bzw. positiv (Lemberger, *et al.* 1994, Steineger, *et al.* 1994). PPAR α -mRNA folgt daher wie die Glucocorticoide einem circadianen Rhythmus (Lemberger, *et al.* 1996). HNF4 α kann durch Bindung an ein DR1-Motiv im PPAR α -Promotor ebenfalls die PPAR α -Transkription aktivieren (Pineda Torra, *et al.* 2002). Sowohl Stress als auch Fasten verstärkte die Expression von PPAR α -mRNA (Lemberger, *et al.* 1996).

PPAR α ist wie einige andere NRs ein Phosphoprotein und wird daher durch Phosphorylierung beeinflusst. So konnte Insulin, obwohl es die PPAR α -Expression hemmte, die PPAR α -Aktivität über die Aktivierung der Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase (MAPK) verstärken (Blanquart, *et al.* 2004, Lazennec, *et al.* 2000, Shalev, *et al.* 1996). Außerdem bildet das PPAR α mit RXR α permissive Heterodimere. Sowohl PPAR α -Liganden als auch RXR α -Liganden wie 9-*cis*-Retinsäure können nach Bindung an den jeweiligen Partner allein oder gemeinsam das Heterodimer aktivieren (Kliwer, *et al.* 1992).

Corepressoren wie der Nukleäre-Rezeptor-Corepressor (N-CoR) verhindern die Bindung von Coaktivatoren vor Ligandbindung. Sowohl CBP/ p300 (CREB-Bindeprotein) als auch SRC-1 und DRIP205/ TRAP220-Komplex (PBP) können, wenn der Rezeptor mit einem Liganden besetzt ist, als Cofaktoren mit der AF2 des PPAR α assoziieren und die Aktivität fördern (Blanquart, *et al.* 2004, DiRenzo, *et al.* 1997, Jia, *et al.* 2004). PBP ist essentiell für die PPAR α -abhängige Aktivierung der Transkription von Zielgenen (Jia, *et al.* 2004).

1.3.3 Aktivatoren und Zielgene von PPAR α

PPAR α kann durch endogene und synthetische Liganden aktiviert werden. Langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, deren Thioester und Eicosanoide wie Leukotrien B₄ oder Prostaglandin D₂ gehören zu den wirksamsten endogenen PPAR α -Liganden (Corton, *et al.* 2000, Forman, *et al.* 1997, Lin, *et al.* 1999, Schroeder, *et al.* 2005). Die endogene Aktivierung von PPAR α tritt vor allem während des Fastens auf, da große Mengen an freien Fettsäuren in das Blut übertreten (Kersten, *et al.* 1999). Jedoch auch Fettsäuren in der Nahrung können zur Aktivierung von PPAR α beitragen (Jump 2002, Pawar und Jump 2003). Synthetische Liganden gehören meist zur Klasse der Fibrate wie Clofibrat und Fenofibrat, aber auch WY 14643 und GW 7647 können PPAR α aktivieren. Fibrate werden zur Behandlung der Dyslipidemie als Ursache von Herz-Kreislauf-Erkrankungen eingesetzt. PPAR α beeinflusst hauptsächlich den Fett-, Glucose- und Proteinstoffwechsel, aber auch die Biotransformation, die Akutphase-Antwort und den Cholesteroll-Katabolismus (Mandard, *et al.* 2004).

Im Fettstoffwechsel fördert PPAR α vor allem katabole Prozesse, die zur Sicherung der Energiebereitstellung aus den Fettreserven beitragen. So werden der Fettsäuretransport

(L-FABP, *cytosolic fatty acid binding protein*), die Fettsäureaktivierung (LCAS *long chain acyl Coa synthase*), die mitochondriale (CPT1, Carnityl-Palmityltransferase 1) und peroxisomale β -Oxidation (ACO, Acyl-CoA-Oxidase; BIEN, bifunktionales Enzym), die mikrosomale ω -Oxidation (CYP4A1) sowie die Ketogenese (HMG-CoA-Synthase) gefördert und der Lipoproteinmetabolismus zugunsten von HDL (Apo-AI) verschoben (Mandard, *et al.* 2004). Außerdem fördert PPAR α die Gluconeogenese aus Alanin, Laktat oder Glycerol (Patsouris, *et al.* 2004). Gefastete PPAR α -(-/-) Mäuse sind daher aufgrund einer gestörten Ketonkörpersynthese und verminderter Gluconeogenese stark hypoglykämisch. PPAR α wirkt antiinflammatorisch, da es die Expression positiver Akutphase-Proteine hemmt (Blanquart, *et al.* 2004, Gervois, *et al.* 2004, Gervois, *et al.* 2001, Kleemann, *et al.* 2003). Ursache dafür könnte eine Hemmung von CEBP β (*CCAAT box/enhancer-binding protein*) durch PPAR α sein (Gervois, *et al.* 2001). PPAR α hemmt weiterhin CYP7A1, das Schlüsselenzym des Gallensäurestoffwechsels und antagonisiert damit die Wirkung der NRs LXR α und HNF4 α . Die LXR α -Transkription hingegen wird durch PPAR α induziert (Tobin, *et al.* 2000).

1.4 Weitere nukleäre Rezeptoren der Leber

PXR, FXR und LXR weisen viele Parallelen zu CAR und PPAR α auf. Auch sie sind hepatische Lipid-aktivierte nukleäre Rezeptoren, die ihre Liganden mit relativ niedriger Affinität binden und mit RXR α heterodimerisieren. HNF4 α hingegen ist von großer Bedeutung für die basale Transkription hepatischer Gene und somit für die hepatische Entwicklung.

1.4.1 Der Pregnan-X-Rezeptor (PXR)

PXR wird durch Steroide und Fremdstoffe aktiviert und reguliert die Expression der CYP3-Genfamilie (Pascussi, *et al.* 2003). Er kommt in vielen Spezies vor, so auch Nagern, Kaninchen und Menschen und wird am stärksten in der Leber, aber auch dem Darm GR-abhängig exprimiert. Er ist neben dem VDR der engste Verwandte von CAR und kann auch CAR-Zielgene aktivieren. PXR ist in Mäusen wahrscheinlich an CCRP und HSP90 gebunden, im Cytoplasma lokalisiert und transloziert nach Ligandbindung in den Zellkern (Squires, *et al.* 2004). RXR α :PXR Heterodimere binden bevorzugt an DR3 oder IR6-Motive. Die LBD von PXR ist nur zu 75-80 % zwischen den einzelnen Spezies konserviert. Es bindet aufgrund seiner sehr großen LBP speziesspezifisch eine große Vielzahl von Substanzen, unter anderem Steroide wie Pregnelenon, Phytoöstrogene oder Dexamethason, aber auch Fremdstoffe wie Pregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN) und Gallensäuren. Eines der bedeutendsten PXR-Zielgene ist CYP3A4, das am stärksten exprimierte Cytochrom P450.

1.4.2 Der Farnesoid-X-Rezeptor (FXR)

Die Hauptaufgabe von FXR ist die Regulation des Gallensäure-Metabolismus. Daher wird er auch BAR (*Bile acid receptor*) genannt. Außerdem fördert er die Glycogenspeicherung. FXR wird hauptsächlich in der Leber, aber auch dem Darm und den Nieren exprimiert und kommt in vier Spleißvarianten vor (Eloranta und Kullak-Ublick 2005). RXR α :FXR bindet bevorzugt an IR1-, aber auch DR3- und DR4-Motive. FXR wird moderat durch Isoprenoide und all-*trans*-Retinsäure aktiviert, jedoch ohne dass sie selbst in der LBP binden. Wang *et al.* entdeckten, dass FXR Gallensäuren wie Litochol- und Chenodeoxychol-Säure bindet, und durch sie stark aktiviert wird (Wang, *et al.* 1999). Gallensäuren sind extrem toxische endogene Metaboliten. FXR fördert daher zum einen die Expression von Enzymen des Gallensäure-Abbaus wie UGT2B4, welches Gallensäuren glucuronidiert, oder Bacs (*bile acid-CoA synthetase*) und Bat (*bile acid-CoA:aminoacid N-acetyltransferase*), die die Konjugation der Gallensäuren an Taurin oder Glycin vermitteln. Zum anderen exprimiert er Enzyme des Exports der Gallensalze wie die BSEP (*Bile salt export pump*) und das MDR3 (*multidrug resistance protein 3*) aus der Familie der ATP-Bindekassette-Transporter und auch das I-BABP (*ileal bile acid binding protein*), welches den Rücktransport der Gallensäuren gewährleistet. Desweiteren aktiviert FXR die Expression von SHP (*small heterodimer partner*), das dann unter anderem zur Reduktion der CYP7A1-Expression führt, dessen Funktion als Cholesterol-7 α -Hydroxylase den entscheidenden Schritt bei der Synthese von Gallensäuren aus Cholesterol darstellt (Eloranta und Kullak-Ublick 2005). FXR-(-/-)-Mäuse zeigen eine gestörte Glycogenspeicherung, da der Insulin-sensitive Glycogenaufbau durch die dephosphorylierte Glycogensynthase gestört ist (Zhang, *et al.* 2006).

1.4.3 Der Leber-X-Rezeptor- α (LXR α)

LXR α wird vor allem in der Leber, aber auch im Darm den Nieren, der Milz und im Fettgewebe exprimiert und kontrolliert den reversen Cholesteroltransport sowie die Triacylglycerolsynthese. Das RXR α :LXR α -Heterodimer erkennt bevorzugt DR4-Motive in den Promotoren von Zielgenen. Natürliche Liganden sind Oxysterole und 6 α -Hydroxy-Gallensäuren. 24,25(S)-Epoxycholesterol, welches aus Squalen entsteht und in der Leber nach Cholesterolzufuhr akkumuliert, ist der stärkste natürliche Ligand von LXR α . Aber auch andere Oxysterole und 6 α -Hydroxy-Gallensäuren können LXR α aktivieren. Dabei ist eine durch Monooxygenierung entstandene 24-oxo-Gruppe der Sterole entscheidend für deren Ligandbindung. Neuere Untersuchungen zeigen, dass auch Glucose an LXR α bindet und den Rezeptor aktiviert (Mitro, *et al.* 2007). Die Aktivität von LXR α kann durch Phosphorylierung beeinflusst werden. LXR α -Zielgene sind CYP7A1, welches die Synthese der Gallensäuren einleitet, SREBP1c (*sterol regulatory element binding protein 1c*), das maßgeblich die

Fettsäuresynthese fördert, sowie ABC-Transporter (Chiang, *et al.* 2001, Handschin und Meyer 2005, Pawar, *et al.* 2003). Die *helix-loop-helix*-Transkriptionsfaktoren SREBP1a, SREBP1c und SREBP2 kontrollieren den Sterolspiegel. Sinkt er, wird der aktive Teil der SREBPs abgespalten, transloziert in den Zellkern und induziert Zielgene. Infolgedessen werden Signalwege des Lipidmetabolismus, z.B. die Cholesterolsynthese (SREBP2) sowie die Fettsäure und Triacylglycerolsynthese (SREBP1a und c) aktiviert. Das LXR α -abhängig induzierte SREBP1c ist der prädominante Subtyp in der Rattenleber (Jump 2002).

1.4.4 Der Hepatische-Nukleäre-Faktor-4- α (HNF4 α)

Der NR HNF4 α findet sich hauptsächlich in Leber, Nieren, Pankreas und Darm. Er kann als Homodimer an DR1-Motive binden und ist wichtig für die Differenzierung von Hepatozyten sowie die Glucose- und Lipidhomeostase (Adamson, *et al.* 2006, Ding, *et al.* 2006, Watt, *et al.* 2003). HNF4 α (-/-)-Embryonen sind lethal. Der leberspezifische Transkriptionsfaktor HNF1 α wird durch HNF4 α induziert. HNF1 α verstärkt dann wiederum in einer Art "feed forward"-Regulation die HNF4 α -Expression (Gagnoli, *et al.* 1997, Hatzis und Talianidis 2001, Magenheim, *et al.* 2005, Zhong, *et al.* 1994). Im Menschen führt im heterozygoten Zustand eine Mutation im HNF4 α -Gen zum Phänotyp des MODY 1 (*maturity onset diabetes of the young*). und eine Mutation im HNF1 α -Gen zum Phänotyp des MODY 3. Die HNF4 α -Expression wird durch das Wachstumshormon GH (*growth hormone*) diurnal und geschlechtsspezifisch reguliert (Wiwi und Waxman 2004). Neben Enzymen des Glucose- und Lipidstoffwechsels, wie die L-Pyruvatkinase, die Fettsäuresynthase oder CYP7A1 reguliert HNF4 α auch Enzyme der Biotransformation, so z.B. CYP3A4, 2B6, 2C9 und 2D6 (Adamson, *et al.* 2006, Jover, *et al.* 2001), aber auch Transkriptionsfaktoren, wie CAR, PXR und PPAR α (Kamiyama, *et al.* 2007, Pineda Torra, *et al.* 2002). HNF4 α weist Besonderheiten auf. Er besitzt eine ungewöhnlich lange C-terminale Domäne, die die Ausbildung von 2 unterschiedlichen Ligandbindetaschen ermöglicht. In der Ligandbindedomäne befindet sich die Fettsäuretasche (FAP, *fatty acid pocket*), die gesättigte Fettsäuren (FS) gebunden hat und in unmittelbarer Nachbarschaft, unter Einbeziehung der langen C-terminalen Domäne, die sogenannte Acyl-CoA Bindestelle (ACS). Ist eine gesättigte FS-CoA in der ACS gebunden, katalysiert diese die Abspaltung des CoA-Restes von gebundenen FS-CoA, denn sie besitzt Thioesteraseaktivität. Die abgespaltene FS kann dann in die FAP wandern und wird dort bevorzugt gegenüber freien FS gebunden. Die C-terminale Domäne mit der ACS definiert die hohe Affinität von HNF4 α zu Fettsäure (FS)-CoA gegenüber freien Fettsäuren (Petrescu, *et al.* 2005). Ist die Zufuhr von FS-CoA Defekt (MODY1) kann eine exzessiv hohe Konzentration an freien FS den Aktivitätsverlust ausgleichen. Da ungesättigte FS-CoA oder Peroxisomenproliferator-CoA die ACS blockieren wirken sie als HNF4 α -Antagonisten (Schroeder, *et al.* 2005).

1.5 Die Zielstellung

Der nukleäre Rezeptor PPAR α ist der Regulator des Fettsäurekatabolismus. Er sichert die Bereitstellung von Energie aus Triglyceriden. Durch freie Fettsäuren aktiviertes PPAR α fördert über die Induktion von Zielgenen den Fettsäuretransport, die Fettsäureaktivierung, die β -Oxidation, die ω -Oxidation sowie die Gluconeogenese. Der Anstieg an freien Fettsäuren beim Fasten, aber auch im Diabetes führte zur Aktivierung von PPAR α . Interessanterweise stellte man in diesen beiden Stoffwechsellagen auch eine erhöhte Expression von CAR und CAR-Zielgenen fest, die Auswirkungen auf den Abbau von Xenobiotika und Hormonen durch CAR-abhängig induzierte Enzyme des Fremdstoffmetabolismus haben kann. Zum Beispiel konnte der Grundumsatz von Mäusen durch CAR-abhängige Steigerung des Abbaus von Schilddrüsenhormonen gesenkt werden, was eine Kommunikation von PPAR α - und CAR-Signalwegen nahe legt.

Das hauptsächliche Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, diese Kommunikation anhand des Einflusses von PPAR α -Agonisten auf das CAR-Modelenzym CYP2B aufzuklären. Zunächst sollte anhand von Zeitabhängigkeiten und Dosiswirkungskurven die CYP2B-Aktivität charakterisiert sowie die CYP2B1-mRNA-Expression und die Transkription eines Reportergens unter der Kontrolle von 2,65 kb des CYP2B1-Promotors der Ratte bzw. aufeinanderfolgender Deletionskonstrukte ermittelt werden. Außerdem sollte der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CAR-Expression und die CAR-Transkription überprüft werden. Mithilfe der Ergebnisse der CYP2B1- und CAR-Promotor-Reportergenstudien sollten ferner PPAR-Agonisten-responsive Promotorbereiche lokalisiert und die verantwortlichen Transkriptionsfaktoren identifiziert werden.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die physiologische Relevanz der *in vitro* erzielten Ergebnisse zu beurteilen. In einer Ganztierstudie mit männlichen Ratten sollte untersucht werden, ob eine schwache PB-abhängige Induktion der CYP2B-Aktivität, wie sie z.B. auch Insektizide hervorrufen, durch Behandlung mit PPAR α -Agonisten vervielfacht werden kann. Da neben mehrfach ungesättigten Fettsäuren auch das von hepatischen residenten Makrophagen (Kupferzellen) freigesetzte Prostaglandin D₂ (PGD₂) PPAR α aktivieren kann, wurde abschließend untersucht, inwieweit die Behandlung von primär kultivierten Hepatozyten mit PGD₂ die PB-abhängige Expression des CAR-Zielgens CYP2B1 steigern bzw. die CAR-Expression induzieren kann.

2 MATERIAL

2.1 Tiere und Tierhaltung

Es wurden männliche Wistar-Unilever-Ratten aus der Zucht der Firma Charles River (Sulzfeld) verwendet. Zur Isolierung von Hepatozyten wurden 200 - 350 g schwere Ratten ausgewählt. Die Tiere wurden in einem 12-stündigen Hell/Dunkel-Rhythmus (7-19 Uhr Hellphase) bei einer RT von 19-23 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % gehalten. Sie wurden mit der Rattenhaltungsdiät 1326 (altromin, Gesellschaft für Tierernährung, Lage) unter freiem Nahrungs- und Wasserzugang ernährt.

2.2 Biochemikalien

3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Roth	Karlsruhe
25-Hydroxy-Cholesterol (γ - ³² P) ATP	Sigma-Aldrich GE-Healthcare	Deisenhofen Freiburg
Aceton	Roth	Karlsruhe
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30, 37,5:1)	Roth	Karlsruhe
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40, 29:1)	Roth	Karlsruhe
Agarose "Molecular Biology Grade"	Eurogentec	Köln
Ammoniumpersulfat (APS)	Biomol	Hamburg
Ampicillin	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Borsäure (kristallin)	Merck	Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth	Karlsruhe
Bromphenolblau (Natriumsalz)	Roth	Karlsruhe
Calciumchlorid-2-hydrat	Merck	Darmstadt
Carbogen [95 % O ₂ , 5 % CO ₂ (19:1)]	Air Liquide	Potsdam
Chloroform	Roth	Karlsruhe
D(+)-Glucose Monohydrat	Roth	Karlsruhe
DEPC	Roth	Karlsruhe
Dexamethason-21-Acetat	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth	Karlsruhe
dNTP-Set	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Essigsäure	Roth	Karlsruhe
Ethanol (reinst)	Roth	Karlsruhe

Ethanol (vergällt)	Roth	Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
EGTA	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Ficoll PM 400	GE-Healthcare	Freiburg
Fischöl	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Formaldehyd	Roth	Karlsruhe
Formamid	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Glycerol	Roth	Karlsruhe
β -Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Glycin	Roth	Karlsruhe
Glycogen	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Guanidiumthiocyanat	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
GW 7647:	Biotrend	Köln
2-[[4-[2[[[(Cyclohexylamino)-carbonyl](4-cyclohexylbutyl)-amino]ethyl]phenyl]thio]-2-methylpropansäure		
Hefe-Extrakt	GIBCO	Eggenstein
HEPES	Roth	Karlsruhe
Heringsperma DNA	Roche Applied Science	Basel, CH
Insulin	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Isoamylalkohol	Roth	Karlsruhe
Isopropanol (2-Propanol)	Roth	Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth	Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck	Darmstadt
Laktat (60 % (w/w) Sirup, Natriumsalz)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
LB-Agar (Lennox)	Roth	Karlsruhe
Leupeptin	Biomol	Hamburg
L-Glutamin	Roth	Karlsruhe
Magermilchpulver	Sucofin	Zeven
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth	Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Roth	Karlsruhe
Methanol	Roth	Karlsruhe
Narcoren (Wirkstoff Pentobarbital-Natrium: 16,0 g in 100 ml)	Merial GmbH	Hallbergmoos

Natriumacetat	Roth	Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth	Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat	Roth	Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth	Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Natrium-Pyruvat	Merck	Darmstadt
n-Butanol (1-Butanol)	Roth	Karlsruhe
Neonatales Kälberserum (NCS)	Biochrom AG	Berlin
N-Laurylsarcosin	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Olivenöl	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈	GE Healthcare	Freiburg
o-Phosphorsäure	Roth	Karlsruhe
Pefablock	Biomol	Hamburg
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG	Berlin
Percoll™	GE Healthcare	Freiburg
Phenol aqua	Roth	Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Prostaglandin D ₂ (PGD ₂)	Axxora	Grünberg
Rotiszint® 22	Roth	Karlsruhe
Salzsäure (37 % (v/v))	Roth	Karlsruhe
Serdolite MB	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Serva Blue G (Nr.35050)	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Stickstoff, flüssig	Air Liquide	Berlin
TEMED p.a.	Roth	Karlsruhe
Tetracyclin	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Trichloressigsäure	Roth	Karlsruhe
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Applichem	Darmstadt
Tris	Roth	Karlsruhe
Triton® X-100	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Trypsin-Inhibitor	Biomol	Hamburg

Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	Roth	Karlsruhe
Tween® 20	Roth	Karlsruhe
WY 14643	Biotrend	Köln
[[4-Chloro-6-[(2,3-dimethylphenyl)amino]- 2-pyrimidinyl]thio]essigsäure		

2.3 Verbrauchsmaterialien

Braunüle(R) 18G 1 3/4 " (1,3 x 45 mm), Venenverweilkanülen aus PE	Braun	Melsungen
Combitips plus, 50 ml	Eppendorf	Hamburg
Einmal-Injektions-Kanülen	Heiland	Gallin
Einmal-Latex-Untersuchungshandschuhe	Roth	Karlsruhe
Einmal-Spritzen, 1 ml	Heiland	Gallin
Einmal-Spritzenfilter; CA-Membran; 0,2/ 0,4 µM	Heinemann Labortechnik	Duderstadt
Faltenfilter	Schleicher und Schnell	Dassel
Gel Blotting Papiere	Roth	Karlsruhe
Hybond N	GE-Healthcare	Freiburg
Mikrospritze, 100 µl	Roth	Karlsruhe
Nylonnetz Scrynel NY 79 HD	Züricher Beuteltuchfabrik	Zürich, Schweiz
Parafilm®	American National Can™	Menasha, WI, USA
Pasteurpipetten	Roth	Karlsruhe
Pipettenspitzen	Roth	Karlsruhe
Pipettenspitzen	Sarstedt	Nümbrecht
Pipettenspitzen	Heinemann Labortechnik	Duderstadt
Polypropylenröhrchen 15 ml, steril	Greiner bio-one	Nürtlingen
Polypropylenröhrchen 50 ml, steril	Sarstedt	Nümbrecht
Reaktionsgefäße 0,2 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Reaktionsgefäße 2 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Roti®-PVDF-Membran	Roth	Karlsruhe
Zell- und Gewebekulturschalen, 60x10 mm	Greiner bio-one	Nürtlingen
Zell- und Gewebekulturschalen, 35x10 mm	Greiner bio-one	Nürtlingen

Zell- und Gewebekulturschalen, 35x10 mm	Nunc™	Roskilde, Dänemark
Mikrospin TM G-25 Columns	GE-Healthcare	Freiburg
Mikrotiterplatten (96 well, klar)	Greiner bio-one	Nürtlingen
Mikrotiterplatten (96 well, FluoroNunc MaxiSorp weiß)	Nunc™	Roskilde, Dänemark
Mikrotiterplatten (96 well, FluoroNunc MaxiSorp schwarz)	Nunc™	Roskilde, Dänemark
Zellschaber 25 cm	Sarstedt	Nümbrecht

2.4 Geräte

Automatische Pipettierhilfe, Finnpipette®	ThermoLabSystem	Frankfurt am Main
Automatische Pipettierhilfe, Gilson	Gilson	Hamburg
Typ P10, P20, P200, P1000	Eppendorf	
Automatische Pipettierhilfe, Pipet Aid XP	Drummond	Broomall, PA, USA
Automatische Pipettierhilfe, pipetus® akku	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt
Automatische Pipettierhilfe, Typ Multipipette plus	Eppendorf	Hamburg
Begasungsbrutschrank Nu Aire IR Autoflow	Zapf Instruments	Sarstedt
CEQ™ 2000XL DNA Analysis System	Beckman Coulter	München
ChemiDoc™-System	Bio-Rad	München
Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik GmbH	Oberschleißheim
Eismaschine	Ziegra	Isernhagen
Elektrophorese-System Mini-Protean II	Bio-Rad	München
Flachbett-Elektrophoresekammer	Biometra	Göttingen
Fluostar Optima	BMG	Offenburg
Gene Pulser® II	Bio-Rad	München
Hettich-Rotor 1462	Hettich	Tuttlingen
Hettich-Rotor 1617	Hettich	Tuttlingen
Hettich-Zentrifuge Rotina 35	Hettich	Tuttlingen
Hettich-Zentrifuge Universal 16	Hettich	Tuttlingen
High Voltage Power Pack P30	Biometra	Göttingen
iCycler	Bio-Rad	München
Laborbrenner Gasprofi 1	Wartewig-Labortechnik	Göttingen

Laborwaage Sartorius	Sartorius	Göttingen
Lauda-Thermostat Typ K2	Lauda	Lauda-Königshofen
Magnetrührer mit Heizblock MR 3001	Heidolph	Göttingen
Mikroskop Wilovert A	Hund	Wetzlar
Mikrowelle "Microstar"	Quelle	Fürth
Oxygenator	Universität Göttingen	Göttingen
Peristaltikpumpe PD5001 mit Pumpkopf Sp quick	Heidolph	Göttingen
pH-Meter inoLab pH Level 1	WTW	Weilheim
Pulse Controller Plus	Bio-Rad	München
Schüttelapparat TM 130-6	GFL	Burgwedel
Schüttelinkubator 3031	GFL	Burgwedel
Schüttelmaschine LS10	Gerhardt	Göttingen
Sicherheitswerkbank Nu Aire Class II	Zapf Instruments	Sarstedt
SIGMA Rotor 12154-H	SIGMA	Osterode
SIGMA Zentrifuge 3K30	SIGMA	Osterode
SORVALL® RC 5B PLUS-Zentrifuge	Thermo Electron Corporation	Langenselbold
SORVALL® SLA-1500-Rotor	Thermo Electron Corporation	Langenselbold
SORVALL® SS-34-Rotor	Thermo Electron Corporation	Langenselbold
Spannungsgerät Power Pac 300	Bio-Rad	München
Spannungsquelle	Biometra	Göttingen
Spectro-Photometer Ultrospec 2100 pro	GE Heathcare	Freiburg
Thermocycler T300	Biometra	Göttingen
Thermoshaker Schutron TS 2-24	Haep Labor Consult	Bovenden
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus	Osterode
Tischzentrifuge Biofuge Primo	Heraeus	Osterode
Transblot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad	München
Trockensterilisator Typ SUT 6120	Heraeus	Osterode
Ultraschallbad Bandelin Sonorex	Bandelin	Berlin
Ultraschallbad Bandelin Typ RK 100	Bandelin	Berlin
Ultraschallstab Bandelin UW 2070, Steuereinheit Bandelin HD 2070, Gehäuse Bandelin LS 5	Bandelin	Berlin

UV-Leuchtkasten	Schütt	Göttingen
Vakuumzentrifuge Speed Vac PD 111V mit Drehschieber-Vakuumpumpe Typ RD4 und Kühlfalle Unicryo MC3I	Thermo Savant Rudolph Brand Uniequip	Holbrook, NY, USA Wertheim Martinsried
Vortex Genie 2	Scientific Industries	Bohemia, USA
Wasseraufbereitungssystem HP6 UV/UF	TAK	Niederelbert
Wasserbad ecoline O11 mit Einhängethermostat A100	Lauda	Lauda-Königshofen

2.5 Zellkultur-Medien

Medium M199 Pulvermedium mit Earle's Salzen, mit L-Glutamin, ohne Natriumhydrogencarbonat	Biochrom AG	Berlin
Williams E Pulvermedium	Sigma-Aldrich	Deisenhofen

Zusammensetzung der Medien (Angaben in mg/l)

	Medium M199 mit Earle's Salzen	Williams E Medium
Ascorbinsäure	2,27	0,05
Biotin	0,5	0,01
Calciferol	0,1	0,1
D-Ca-Pantothenat	1	0,01
Cholinchlorid	1,5	0,5
Folsäure	1	0,01
myo-Inositol	2	0,05
Menadion	0,01	0,01
Nicotinsäureamid	1	0,025
Pyridoxal*HCl	1	0,025
Riboflavin	0,1	0,01
Thiamin*HCl	1	0,01
DL-a-Tocopherolphosphat Na ₂	0,01	0,01
DL-Alanin	90	50
L-Arginin*HCl	50	70
DL-Asparaginsäure	30	60
L-Cystein*HCl	40	0,1
L-Cystin	20	20

	Medium M199 mit Earle's Salzen	Williams E Medium
L-Glutamin	29,2	100
L-Glutaminsäure H ₂ O	44,5	150
Glycin	50	50
L-Histidin*HCl	15	20
DL-Isoleucin	50	40
DL-Leucin	75	120
L-Lysin*HCl	87,46	70
DL-Methionin	15	30
DL-Phenylalanin	25	50
L-Prolin	30	40
DL-Serin	10	50
DL-Threonin	40	60
DL-Tryptophan	10	20
L-Tyrosin	50,45	40
DL-Valin	50	50
Glutathion	0,05	0,5
Fe(NO ₃) ₂ *9 H ₂ O	0,0001	0,7
D-Glucose	2000	1000
Phenol Rot	10,7	17
Calciumchlorid*2 H ₂ O	265	200
Magnesiumsulfat (anhydrous)	97,7	200
Natriumchlorid	6800	6800
Kaliumchlorid	400	400
Natriumphosphat Monobasisch (anhydrous)	122	140
NaHCO ₃	2200	2200
Vitamin B-12	0,2	
Linolsäuremethylester	0,03	
Pyruvat	25	
Retinolessigsäure	0,1	
Kupfersulfat*5 H ₂ O	0,0001	
Manganchlorid*4 H ₂ O	0,0001	
Zinksulfat*7 H ₂ O	0,0002	

	Medium M199 mit Earle's Salzen	Williams E Medium
Asparagin* H ₂ O	20	-
ATP Na ₂		1
AMP		0,2
Nicotinsäure		0,025
p-Aminobenzoesäure		0,05
Pyridoxin*HCl		0,025
Vitamin A		0,1
Cholesterin		0,2
2-Desoxy-D-Ribose		0,5
D-Ribose		0,5
L-Hydroxyprolin		10
Natriumacetat		50
Polysorbat 80 VG		20

2.6 Käufliche Reinigungs- und Nachweissysteme

CEQ™ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Beckman Coulter	München
ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare	Freiburg
GeneJET™ PCR Cloning Kit	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
GFX <i>Micro</i> Plasmid Prep Kit	GE Healthcare	Freiburg
iQ SYBR Green supermix	Bio-Rad	München
JETSTAR 2.0 Plasmid Maxiprep Kit	GENOMED GmbH	Löhne
Luciferase Assay System	Promega	Madison, WI, USA
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen	Hilden
SuperSignal® West Pico	Pierce	Rockford, IL, USA
Chemiluminescent Substrate		
SV Total RNA Isolation System	Promega	Madison, WI, USA

2.7 Enzyme

BIO-X-ACT™ Long

DNA-Polymerase	4 U/ µL	BIOLINE	Luckenwalde
Powerscript DNA-Polymerase	5 U/ µL	Pan	Nürnberg
Dnase I		Promega	Madison, WI, USA
Proteinase K	10 mg/ mL	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Restriktionsendonuklease <i>BglII</i>	10 U/ µL	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Restriktionsendonuklease <i>BstXI</i>	10 U/ µL	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Restriktionsendonuklease <i>EcoRI</i>	10 U/ µL	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Restriktionsendonuklease <i>NheI</i>	10 U/ µL	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Restriktionsendonuklease <i>MluI</i>	10 U/ µL	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Restriktionsendonuklease <i>PstI</i>	10 U/ µL	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Restriktionsendonuklease <i>PvuI</i>	10 U/ µL	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Restriktionsendonuklease <i>SacI</i>	10 U/ µL	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Restriktionsendonuklease <i>XbaI</i>	10 U/ µL	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Restriktionsendonuklease <i>XhoI</i>	10 U/ µL	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
RevertAid™ H Minus M-MuLV	200 U/ µL	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Reverse Transkriptase			
T4 DNA Ligase	5 U/ µL	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
T4-Polynukleotid-Kinase	10 U/ µL	Roche Applied Science	Basel, CH

2.8 Oligonukleotide

2.8.1 ,sense'-Oligonukleotide

r = Ratte; d = distal; c = zentral; p = proximal

F= vorwärts; R= rückwärts

- | | | |
|----|-----------------|---|
| a) | LC-r-ss--ActinF | 5'-CCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGATG-3' |
| b) | rCAR-1F | 5'-TCTCACTCAACACTACGTTC-3' |
| c) | C2B1_F1A | 5'-GAAATGGGGACT <u>ctgcag</u> AAATTGC-3' |
| | | <u>ctgcag</u> → <i>PstI</i> -Erkennungssequenz |
| | C2B1_F2A | 5'-CGGCGG <u>gaattc</u> GCATATAGGGTGCACG-3' |
| | | <u>gaattc</u> → <i>EcoRI</i> -Erkennungssequenz |
| | C2B1_F2B | 5'-CGGCGG <u>gaattc</u> CTAGTAAGTAAACAGAGCTGAC-3' |
| | | <u>gaattc</u> → <i>EcoRI</i> -Erkennungssequenz |

	CYP_PPARmut-F	5'-CAGAAATGAT agcg CACATAGAAAAAG-3' Mutation von CTTT nach agcg
	CYP_ER4mut-F	5'-GACAAA AC cag GCcGAC Attc GctCACCCATC-3' Mutation von TGAGCTGACAAGTGCA nach cagGCcGACAttcGct
d)	rCARprom_F13	5'-CAGAGTGATGAAGACAGAGCTTGG-3'
	rCARprom_F14	5'-CGCAGTAGCAAGCAAACACTAGAGTAG-3'
	rCARprom_F16	5'-CAGAGTGATGAAGACAGAGCTTGG-3'
	rCARprom_ΔDR1d_F	5'-GCCGCC <u>cgatcg</u> GAACTGCTGATTTCCAGAC-3' <u>cgatcg</u> → <i>PvuI</i> -Erkennungssequenz
	rCARprom_ΔDR1c_F	5'-GCCGCC <u>cgatcg</u> GTGGATTCCAGGGGTCAAAG-3' <u>cgatcg</u> → <i>PvuI</i> -Erkennungssequenz
	rCARprom_ΔDR1p_F	5'-GCGGCG <u>cgatcg</u> CTGTGGTACTAGGTGTACAC ATT-3' <u>cgatcg</u> → <i>PvuI</i> -Erkennungssequenz
e)	CYP2B1_oligo	5'-GGTTGGTAGCCGGTGTGA-3'
f)	ACO1_oligo	5'-AGGCTGTGAGGATCAGAGTTC-3'
g)	GAPDH_oligo	5'-CAGGATGCATTGCTGACAATCTTGA-3'
h)	pGL3_RV3	5'-CTAGCAAATAGGCTGTCCC-3'
i)	pJET1_F	5'-GCCTGAACACCATATCCATCC-3'
j)	CAR-EMSA-F	5'-GAGTGTGTATAAAGGTCAGAGAACAACCTG-3'
k)	CAR-ChIP-1cF	5'-AGCACGGAAGCTCCAGAATAAAGA-3'
l)	CPT1_1F	5'-CCAAGCTGTGGCCTTCCAGT-3'

2.8.2 ,antisense'-Oligonukleotide

a)	LC-r-ss-ActinR	5'-AGGTCCCGGCCAGCCAGGTCCAG-3'
b)	rCAR-2R	5'-CTGGAAAAGGATCCAAGCCTGGG -3'
c)	C2B1_R1B	5'-GCCGCC <u>gaattc</u> GTGCGTGCACGCTATATGC-3' <u>gaattc</u> → <i>EcoRI</i> -Erkennungssequenz
	C2B1_R1C	5'-GCCGCC <u>gaattc</u> CTTACTAGGGCATGGG -3' <u>gaattc</u> → <i>EcoRI</i> -Erkennungssequenz
	C2B1_R2C	5'-GATCGC <u>agatct</u> CGAGCCCGG-3' <u>agatct</u> → <i>BglII</i> -Erkennungssequenz
	CYP_PPARmut-R	5'-CTTTTTCTATGTG cgct ATCATTCTG-3' Mutation von AAAG nach cgct

CYP_ER4mut-R	5'-GATGGGTGaGC gaa TGTC gGCctg GTTTTGTC-3' Mutation von TGCACTTGTCACTCA nach aGCgaaTGTCgGCctg
d) rCARprom_R5	5'-CAGGAATTAGGGATTGTGGTCCTC-3'
rCARprom_DING_R	5'-GGTCTCCTGAATGTGGGAGG-3'
rCARprom_ΔDR1d_R	5'-GCCGCC <u>cgatcg</u> GTTAAGCCGTGGCGGCTCGATC-3' <u>cgatcg</u> → <i>PvuI</i> -Erkennungssequenz
rCARprom_ΔDR1c_R	5'-GCCGCC <u>cgatcg</u> CACACTCAGTGGCTCATTGG-3' <u>cgatcg</u> → <i>PvuI</i> -Erkennungssequenz
rCARprom_ΔDR1p_R	5'-GCGGCG <u>cgatcg</u> CTGTCTGATATTCTGGGGCTA GAG -3' <u>cgatcg</u> → <i>PvuI</i> -Erkennungssequenz
e) pGL3_GL2	5'-CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCC -3'
h) pJET1_R	5'-GCAGCTGAGAATATTGTAGGAGATC-3'
i) CAR-EMSA-R	5'-GGCCCCTGCAGGTTGTTCTCTGACCTTTATA-3'
j) CAR-ChIP-2cR	5'-TTGGTGTCAAGACAGTGGGTAAAG-3'
k) CPT1_2R	5'-GGACGCCGCTCACAATGTTC-3'

Vektor-Oligonukleotide

Vektor	Oligonukleotid	Position [bp]
pGL3	pGL3_RV3	4760 - 4779
pGL3	pGL3_GL2	281 - 303
pJET	pJET1_F	280 - 300
pJET	pJET1_R	384 - 408

Die „sense“- und „antisense“-Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen. Die Oligonukleotid-Sequenzen wurden aus folgenden Sequenzen erstellt:

Matrize	Oligonukleotide	Genbank Acc.-Nr.	Position [bp]
ACO1	ACO1-oligo	J02752.1	3390-3370
GAPDH	GAPDH_oligo	DQ403053.1	380-356
CYP2B1	CYP2B1_oligo	J00719.1	1002-985
β-Actin	LC-r-ss-ActinF und R	NM_031144	414 - 438; 613 - 635
CPT1	CPT_1F und _2R	NM_031559.2	63 - 82; 354 - 373
CAR:	rCAR-1F und -2R	NM_022941.2	843 - 862; 1282 - 1298
CAR_ChIP	CAR-ChIP-1cF und -2cR	NW_047399.2	4392500-4392523; 4392710-4392733

Matrize	Oligonukleotide	Genbank Acc.-Nr.	Position [bp]
rCARprom4,4	rCARprom_F16 und _R5	NW_047399.2	4389298-4389323; 4393638-4393661
rCARprom2,6	rCARprom_F14 und _R5	NW_047399.2	4391042-4391066; 4393638-4393661
rCARprom1,9	rCARprom_F13 und _R5	NW_047399.2	4391744-4391767; 4393638-4393661
rCARprom2,2 _DING	rCARprom_F13 und _DING_R	NW_047399.2	4391744-4391767; 4393608-4393927

2.9 Molekulare Längenstandards

2.9.1 Protein-Längenstandard

Protein Molecular Weight Marker

MBI Fermentas GmbH St. Leon-Rot

Zusammensetzung

Protein	Molekulargewicht (kDa)
β-Galactosidase	116,0
Rinder-Serumalbumin	66,2
Ovalbumin	45,0
Laktat-Dehydrogenase	35,0
Restriktionsendonuklease <i>Bsp98I</i>	25,0
β-Lactoglobulin	18,4
Lysozym	14,4

Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert und vor der Verwendung 5 min auf 95 °C erhitzt.

2.9.2 DNA-Längenstandard

MassRuler™ DNA Ladder, Mix

MBI Fermentas GmbH St. Leon-Rot

Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

2.10 Vektoren

2.10.1 pGL3-Basic-Vektor

Mit dem pGL3-Basic-Vektor (Abbildung 4) der Firma Promega (Madison, USA), der ein Luciferase-Reportergen enthält, können quantitative Analysen zur Regulation der Genexpression durchgeführt werden. Die Luciferase-Reportergenaktivität ist leicht und sensitiv messbar. Veränderungen in dieser Reportergenaktivität korrelieren direkt mit der

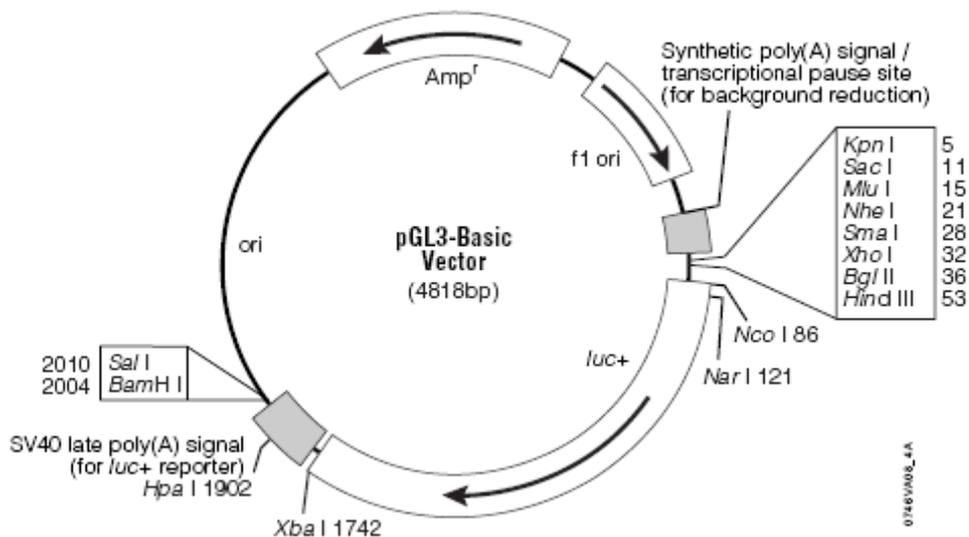


Abb. 5: Die Restriktionskarte des Vektors pGL3-Basic.

(Abkürzungen: Amp^r: Ampicillinresistenzgen; f1 ori: Phage f1 Replikationsstartstelle; *luc+*: Luciferase-Reportergen; ori: Replikationsstartstelle des Plasmids. Die anderen Abkürzungen bezeichnen Restriktionsendonukleasen.)

transkriptionellen Aktivität der in die Polylinkerregion klonierten regulatorischen Genelemente, wenn sie in Zellen exprimiert werden, die mit pGL3-Basic transfiziert wurden. Der pGL3-Basic-Vektor enthält eine modifizierte Luciferase-cDNA aus der nordamerikanischen Feuerfliege (*luc+*). Das SV40 späte poly(A)-Signal sorgt für eine effiziente Prozessierung der Luciferase-RNA. Das synthetische poly(A)-Signal, welches stromaufwärts der Polylinkerregion liegt, dient der Termination von Transkriptionen im Vektor-Rückgrat.

2.10.2 pJet-Vektor

Der pJet-Vektor (Abb. 5) der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) besitzt für die positive Selektion neben einem Ampicillin-Resistenzgen ein Gen für ein Restriktionsenzym (*eco47I*), welches, wenn es exprimiert wird, tödlich für die meisten *E. coli*-Stämme ist. Durch den Einbau eines DNA-Fragments in die Kolonierungsstelle, wird das Gen zerstört. Daher wachsen nach der Transformation nur die Klone die den rekombinierten Vektor + einkloniertem DNA-Fragment aufgenommen haben.

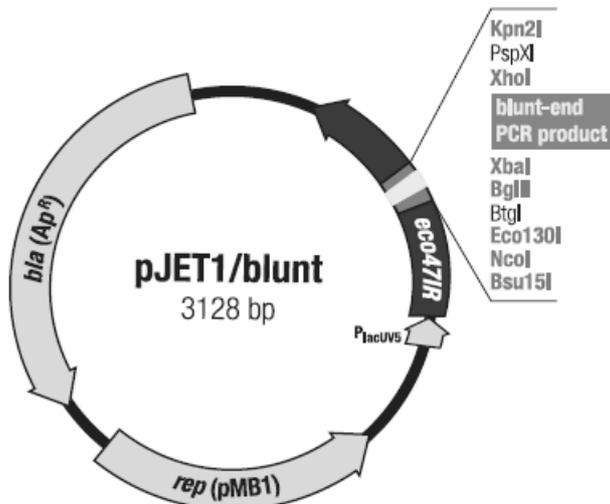


Abb. 6: Die Restriktionskarte des Vektors pJet1/blunt.

(Abkürzungen: bla(AP^R) Ampicillinresistenzgen; rep(pMB1): Replikationsstartstelle; P_{lacUV5}: Promotor für das eco471R-Gen. Die anderen Abkürzungen bezeichnen Restriktionsendonukleasen.)

2.11 *E. coli* XL-1 (blue) Bakterien

E. coli XL-1 (blue)

Stratagen

Heidelberg

recA1;endA1;gyrA96;thi-1;hsdR17;subE44;relA1;lac[FTM];proAB;lacI q ZWM15;Tn10(tet r)

2.12 Antikörper

2.12.1 Monoklonale Antikörper

<u>Bezeichnung</u>	<u>Produkt-Nr.</u>	<u>Hersteller</u>
Monoklonaler Maus-Anti-Ratten	PM20	Oxford
Cytochrome 2B-IgG (H+L)		Biomedical Research Oxford, MI USA

2.12.2 Polyklonale Antikörper

<u>Bezeichnung</u>	<u>Produkt-Nr.</u>	<u>Hersteller</u>
Kaninchen-Anti-Maus NR113	sc-50462	Santa Cruz
(CAR1/2) IgG AS 48-197 (m)		Biotechnology, Inc. Heidelberg
Kaninchen-Anti-Maus NR1C1	sc-9000X	Santa Cruz
(PPAR α) IgG AS 1-98 (h)		Biotechnology, Inc. Heidelberg
Ziege-Anti-Kaninchen IgG (H+L)- HRP Konjugat	170-6515	Bio-Rad München
Ziege-Anti-Maus IgG (H+L)- HRP Konjugat	170-6516	Bio-Rad München

3 METHODEN

ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

3.1 Die Isolierung von Hepatozyten der Ratte nach Meredith (1988)

Hepatozyten wurden durch Lösen des Zellverbands der Leber mittels Perfusion mit Ca^{2+} -freiem und EDTA-haltigem Puffer isoliert. Sie wurden durch niedrigtourige Zentrifugation mit Hilfe eines einstufigen Percoll-Dichtegradienten von Nichtparenchymzellen und Zelltrümmern gereinigt.

3.1.1 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, durch einen 0,2 μm -Filter sterilfiltriert und in autoklavierten Glasflaschen bei 4 °C aufbewahrt. H_2O bezeichnet immer Reinstwasser. Wenn nicht anders angegeben wurde der pH-Wert mit 1 N NaOH und 1 N HCl eingestellt.

Perfusionspuffer-Stammlösung (10x)

NaCl	1400 mM	81,820 g
KCl	50 mM	3,728 g
$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	8 mM	1,626 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	16 mM	2,848 g
KH_2PO_4	4 mM	0,544 g
H_2O		ad 1000 mL

Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 7,4 eingestellt.

NaHCO_3 -Stammlösung (1 M)

NaHCO_3	1 M	8,4 g
H_2O		ad 100 mL

Die Lösung wurde bei RT gelagert.

EDTA-Stammlösung (0,5 M)

EDTA	0,5 M	14,61 g
H_2O		ad 100 mL

Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 8,0 eingestellt.

Glucose-Stammlösung (2 M)

D-Glucose x H ₂ O	2 M	39,63 g
H ₂ O		ad 100 mL

Laktat-Stammlösung (0,5 M)

Laktat-Sirup (60 % (w/w))	0,5 M	7 mL
H ₂ O		ad 100 mL

Pyruvat-Stammlösung (200 mM)

Pyruvat	200 mM	2,2 g
H ₂ O		ad 100 mL

Calciumchlorid-Stammlösung (2 M)

CaCl ₂	2 M	29,4 g
H ₂ O		ad 100 mL

Die Lösung wurde in Aliquots von 10 mL bei -20 °C gelagert.

Perfusionspuffer

Perfusionspuffer-Stlsg. (10x)	1x	200 mL	
NaHCO ₃	25 mM	50 mL	1 M Stlsg.
EDTA	2 mM	8 mL	0,5 M Stlsg.
Glucose	15 mM	15 mL	2 M Stlsg.
Laktat	2 mM	8 mL	0,5 M Stlsg.
Pyruvat	0,2 mM	2 mL	200 mM Stlsg.
H ₂ O		ad 2000 mL	

Das Medium wurde bei 37 °C für 45 min mit Carbogen [95 % O₂, 5 % CO₂] äquilibriert. Danach wurde der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt.

Waschpuffer

Perfusionspuffer-Stlsg. (10x)	1x	50 mL	
CaCl ₂ x H ₂ O	1 mM	250 µL	2 M Stlsg.
H ₂ O		ad 500 mL	

Das Medium wurde bei 37 °C für 45 min temperiert. Danach wurde der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt.

Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugationsmedium

Percoll	27,8 mL
Puffer-Stammlösung (10x)	4,2 mL

Physiologische NaCl-Lösung

NaCl	0,9 % (w/v)	9 g
H ₂ O		ad 1000 mL

Medium 199 (M199)

Pulvermedium M199 mit Earle's

Salzen ohne NaHCO ₃		9,77 g
D-Glucose x H ₂ O	5,5 mM	1,10 g
HEPES	15 mM	3,57 g
NaHCO ₃	18 mM	1,51 g
BSA	0,2% (w/v)	2,00 g
H ₂ O		ad 1000 mL

Das Medium wurde mit Carbogen äquilibriert und der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt.

3.1.2 Die nicht rezirkulierende *in situ*-Perfusion der Rattenleber zur Isolierung von Hepatozyten

Männliche Wistar-Ratten (200–300 g KG) wurden durch intraperitoneale Injektion von 16 µg Pentobarbital-Natrium (Narcoren)/ 100 g Körpergewicht narkotisiert. Anschließend wurde die Ratte mit Stecknadeln auf dem Präparationstisch fixiert und die Bauchregion mit 70% (v/v) Ethanol desinfiziert. Nach Entfernen der Bauchhaut wurde das Abdomen durch Längsinzision entlang der Linea alba bis zum Processus xyphoideus eröffnet. Der Leberhilus wurde durch Verlagern des Darmkonvoluts freigelegt und die Vena portae freipräpariert. Zum späteren Fixieren der Braunüle wurde eine Ligatur locker um die Vena portae cranial der Vena lienalis gelegt. Die Vena portae wurde nun mit einer Braunüle kanüliert, die Vena cava inferior distal der Vena renales eröffnet und die Leber mit einer Flussgeschwindigkeit von 40 mL / min mit dem durch den Oxygenator auf 37 °C erwärmten und mit Carbogen begasten Perfusionspuffer (2 L) 45–60 min nicht-rezirkulierend perfundiert. Nach Eröffnen der Vena cava inferior wurde die Braunüle in der Vena portae mit der Ligatur in der gewünschten Position fixiert. Während die Leber blutleer gespült wurde, wurde der Thorax durch bis zur Clavicula reichende paramediane Längsinzisionen eröffnet.

3.1.3 Die Präparation von Hepatozyten der Ratte

Nach der Perfusion wurde die Leber aus dem Abdomen freipäpariert und in eine Glasschale überführt, die mit Waschpuffer gefüllt war. Mit Hilfe einer Pinzette wurde die Leberkapsel zerrissen und möglichst vollständig vom Leberhilus abgezogen, wodurch sich die Zellen aus den Leberlappen lösten. Zur Entfernung von Resten des Bindegewebes und größerer Zellverbände wurde die Zellsuspension durch ein mit Waschpuffer befeuchtetes Nylon-Sieb (Porengröße 80 - 100 μm) filtriert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 2 min bei $20 \times g$ (300 rpm, Heraeus-Biofuge Primo, RT), ohne Bremskraft zentrifugiert, damit Nichtparenchymzellen sowie tote Zellen und Zelltrümmer, die nach der Zentrifugation im Überstand verbleiben, von den Hepatozyten im Sediment getrennt werden konnten. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellsediment in 50 mL Waschpuffer resuspendiert und nochmals zentrifugiert.

3.1.4 Die Reinigung von Hepatozyten der Ratte durch Dichtegradienten-Zentrifugation

Das Zellsediment nach der dritten Zentrifugation wurde mit Waschpuffer auf 16 mL aufgefüllt und mit 32 mL Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugationsmedium vermischt. Die Percoll-Endkonzentration betrug 58 % (v/v). Die Suspension wurde 5 min bei $800 \times g$ (2100 rpm, Hettich-Zentrifuge Rotina 35, RT), ohne Bremskraft zentrifugiert. Nichtparenchymzellen, tote Hepatozyten sowie Zelltrümmer, die sich in einer Bande auf dem Gradienten befanden, wurden zusammen mit dem überschüssigen Puffer abgesaugt. Das Hepatozytensediment wurde ausgewogen und mit M199 auf 20 mL aufgefüllt.

3.1.5 Die mikroskopische Zellzählung

2 μL der Hepatozytensuspension wurden mit 198 μL Medium in einer Vertiefung einer Mikrotiterplatte verdünnt (1:100-Verdünnung), und ein Aliquot in einer Neubauer-Kammer (0,0025 mm^2 / Kästchen bei einer Tiefe von 0,1 mm) unter dem Mikroskop bei einer 100-fachen Vergrößerung ausgezählt.

3.2 Zellkulturversuche zur Expression von Cytochrom P450 2B1 in Hepatozyten der Ratte

3.2.1 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben wurde der pH-Wert mit 1 N NaOH und 1 N HCl eingestellt.

Williams E Medium (SIGMA W4125)

Pulvermedium Williams E

ohne NaHCO ₃	10,8 g
NaHCO ₃	2,2 g
H ₂ O	ad 1000 mL

Der pH-Wert des Mediums wurde auf pH 7,4 eingestellt.

Insulin-Stammlösung I

Insulin	10 µM	2,9 mg
BSA	0,1 % (w/v)	50,0 mg
0,9 % (w/v) NaCl-Lösung		ad 50 mL

Insulin-Stammlösung II

Insulin	100 µM	29 mg
BSA	0,1 % (w/v)	50,0 mg
0,9 % (w/v) NaCl-Lösung		ad 50 mL

Insulin wurde bei pH 3 in 20 mL 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung gelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt, anschließend BSA zugegeben, auf 50 mL aufgefüllt und der pH-Wert kontrolliert. Die Lösung wurde durch einen 0,4 µm-Filter sterilfiltriert und in Aliquots bei -20 °C gelagert.

Dexamethason-Stammlösung

Dexamethason	100 µM	2,0 mg
Ethanol p. a.	0,3 % (v/v)	150 µL
0,9 % (w/v) NaCl-Lösung		ad 50 mL

Dexamethason wurde zunächst in Ethanol p.a. gelöst und dann mit 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung verdünnt. Die Lösung wurde durch einen 0,4 µm-Filter sterilfiltriert und in Aliquots bei -20 °C gelagert.

Penicillin-Streptomycin-Lösung

Die Lösung lag bereits als Gemisch von Penicillin (10 000 U) und Streptomycin (10 000 µg/ mL) vor. Sie wurde in 15 mL-Aliquots bei -20 °C gelagert. Den Zellkulturmedien wurden immer 1 % dieses Gemisches, also 100 U Penicillin und 100 µg/ mL Streptomycin, zugesetzt.

ITS (Insulin-Transferrin-Selen) -Stammlösung

ITS bestehend aus

Insulin	87,0 µM	25 mg
Transferrin	62,5 µM	25 mg
Na ₂ SeO ₃	3,0 µM	25 µg

Williams E Medium ad 50 mL

ITS wurde in 5 mL Williams E Medium gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde durch einen 0,4 µm-Filter sterilfiltriert und in Aliquots bei -20 °C gelagert.

Williams-E-Anheftungsmedium

NCS	4 % (v/v)	4 mL	
Insulin	0,5 nM	5 µL	10 µM Stlsg.
Dexamethason	0,1 µM	100 µL	100 µM Stlsg.
Antibiotika	1 % (v/v)	1 mL	
Williams E Medium		ad 100 mL	

Williams-E-Kulturmedium

Insulin	0,5 nM	5 µL	10 µM Stlsg.
Dexamethason	0,1 µM	100 µL	100 µM Stlsg.
Antibiotika	1 % (v/v)	1 mL	
Williams E Medium		ad 100 mL	

GW 7647-Stammlösung

GW 7647	1 mM	502,75 µg
DMSO		ad 1 mL

Die Stammlösung wurde bei -20 °C gelagert.

WY 14643-Stammlösung

WY 14643	100 mM	32,38 mg
DMSO		ad 1 mL

Die Stammlösung wurde bei -20 °C gelagert.

PGD₂-Stammlösung

PGD₂ wurde in einer Konzentration von 10 mM in 70% Ethanol gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Das Lösungsmittel Ethanol wurde vor direktem Gebrauch des PGD₂ abgedampft, und das PGD₂ im zehnfachen an Medium erneut gelöst.

10x PBS-Puffer

NaCl	1370 mM	80,06 g
KCl	27 mM	2,02 g
KH ₂ PO ₄	15 mM	2,06 g
Na ₂ HPO ₄	80 mM	11,36 g
H ₂ O		ad 1000 mL

Der pH-Wert wurde auf pH 7,3 eingestellt. Der Puffer wurde bei RT gelagert.

1x PBS-Puffer

10x PBS-Puffer		100 mL
H ₂ O		ad 1000 mL

Der Puffer wurde bei RT gelagert.

Ethanol 70 % (v/v)

Ethanol	70 % (v/v)	70 mL
H ₂ O		ad 100 mL

3.2.2 Die Herstellung Collagen-beschichteter ZellkulturschalenDie Herstellung der Collagen-Lösung

Rattenschwänze von bis zu 250 g schweren Ratten wurden bei -20 °C aufbewahrt. Ca. 20 Schwänze wurden in 70 % (v/v) Ethanol gereinigt, danach wurde die Haut abgezogen und die Collagenfasern von der Schwanzspitze beginnend mit einer Zange durch Herausbrechen der Wirbel aus dem Bindegewebe gezogen. Die möglichst blutfreien Fasern wurden 4 h unter einer Lampe getrocknet in 2 cm lange Stückchen geschnitten und über Nacht in Aluminiumschälchen unter UV-Licht sterilisiert. Je 0,5 g Fasern wurden in sterilen 250 mL-

Flaschen mit steriler 200-220 mL 0,05 % (v/v) Essigsäure (sterilfiltriert, 0,4 µm-Filter) mindestens 24 h bei 4 °C gerührt. Die Suspension wurde in der Hettich Universal 16-Zentrifuge im Rotor 1264 bei 2640 x g (3980 rpm) 1 h bei 4 °C zentrifugiert, der zähflüssige, klare Überstand in sterile Flaschen überführt und für maximal ein Jahr bei 4 °C gelagert.

Die Beschichtung der Zellkulturschalen

Zellkulturschalen (8,7 cm² oder 28,3 cm²) wurden mit 1 mL Collagen-Lösung benetzt, davon wurden circa 900 µL wieder abgenommen und das verbleibende Collagen in den geöffneten Zellkulturschalen unter der Sterilbank über Nacht getrocknet. Die Zellkulturschalen konnten bei RT 1-2 Monate aufbewahrt werden.

3.2.3 Die Optimierung der Kulturbedingungen für die Cytochrom P450 2B1-Expression in Hepatozyten der Ratte

Hepatozyten wurden isoliert (3.1) und in Medium 199 oder Williams E-Medium, denen beiden 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung, 0,1 µM Dexamethason und 0,5 nM Insulin zugesetzt waren, für 72 h kultiviert. Während der ersten 4 h in Kultur wurde den Medien 4 % neonatales Kälberserum (NCS) zugesetzt. Danach wurden die Hepatozyten nach folgendem Schema inkubiert:

Ansatz	Medienwechsel	1 mM Phenobarbital	1 % (v/v) ITS
1	nach 4 h	-	-
	nach 24 h	-	-
	nach 48 h	-	-
2	nach 4 h	-	+
	nach 24 h	-	+
	nach 48 h	-	+
3	nach 4 h	-	-
	nach 24 h	+	-
	nach 48 h	+	-
4	nach 4 h	-	+
	nach 24 h	+	+
	nach 48 h	+	+

Diese vier verschiedenen Versuchsansätze wurden jeweils mit M199 und Williams E Medium, auf collagenierten oder nicht-collagenierten Kulturschalen durchgeführt. Insgesamt wurden 16 Varianten getestet.

3.2.4 Die optimierten Hepatozyten-Kulturbedingungen für die CYP2B1-Expression

Wenn nicht anders im Ergebnisteil angegeben, wurden alle folgenden Experimente unter für die CYP2B1-Expression optimalen Bedingungen durchgeführt. Die Hepatozytensuspension lag in einer Dichte von $0,66 \times 10^6$ Zellen/ mL Williams-E-Anheftungsmedium vor. Je 3 mL Zellsuspension wurden auf die collagenierten Kulturschalen ($28,3 \text{ cm}^2$) pipettiert. Nach einer Anheftungsphase von 4 h wurde Williams-E-Anheftungsmedium durch Williams-E-Kulturmedium dem anstelle von 0,5 nM Insulin 1x ITS zugesetzt war, ersetzt. Bei dem nächsten Mediumwechsel (24 h in Kultur) wurde das Kulturmedium erneuert, und bei der Hälfte der Kulturschalen 1 mM Phenobarbital (25,42 mg/ 100 mL) zugesetzt. Nach weiteren 24 h (48 h in Kultur) wurden die zuvor entsprechend in Williams E Kulturmedium + ITS bzw. + ITS und PB gelösten Testsubstanzen auf die Hepatozyten gegeben. Im Falle des Standardexperiments waren dies GW 7647 (1 μM), WY 14643 (10 μM) oder als Kontrolle im Lösungsmittel DMSO. Die Ansätze einschließlich der Kontrollen enthielten 0,1 % (v/v) DMSO. Die Hepatozyten wurden während der gesamten Zeit in Begasungsbrutschränken in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % (v/v) CO_2 bei 37 °C kultiviert. Nach Ablauf von 72 h in Kultur wurde die Kultivierung beendet und das Medium abgesaugt. Die Kulturschalen wurden zweimal mit PBS gewaschen, in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

3.2.5 Die Untersuchung des Einfluss eines G_S -gekoppelten Signalweges auf die CAR-Expression

Abweichend von den unter 3.2.4 erläuterten Versuchsbedingungen, wurden die Hepatozyten nach 4 h für die gesamte Dauer des Experiments in Williams E Kulturmedium (0,5 nM Insulin) kultiviert. Nach 24 h Kultur wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach 48 h wurden die Hepatozyten mit 0,1 % (v/v) DMSO, WY 14643 (10 μM), Adrenalin (100 nM) oder einer Kombination aus beidem behandelt. Die Ansätze einschließlich einer Kontrolle enthielten 0,1 % (v/v) DMSO.

3.3 Zellkulturversuche zur Untersuchung der Transkription von CAR und dem CAR-Zielgen CYP2B1 in Hepatozyten der Ratte

3.3.1 Das Prinzip

Die verwendete Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode zur Transfektion stellt eine Modifikation des Protokolls von Graham *et al.* (1973) dar. Die DNA wurde hierbei in Form von feinkörnigen Calcium-Phosphat-Präzipitaten, die durch Mischen einer DNA/Calciumchlorid-

Lösung mit einer phosphathaltigen Lösung entstanden, auf die Zellen aufgebracht und von diesen durch Endocytose aufgenommen.

3.3.2 Puffer und Lösungen

Zusätzlich zu unter 3.2.1 aufgeführten Puffern und Lösungen wurden folgende verwendet.

M199-Transfektionsmedium

NCS	4 % (v/v)	4 mL	
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)	1 mL	
Dexamethason	100 nM	100 µL	100 µM Stlsg.
Insulin	0,5 nM	5 µL	10 µM Stlsg.
25-Hydroxycholesterol	2,5 µg/ mL	100 µL	1000x Stlsg.
Medium 199		ad 100 mL	

Das Medium wurde auf 37 °C temperiert

2 M Calciumchlorid-Lösung siehe 3.1.1

2x HEPES-Puffer

HEPES	50 mM	1,19 g	
NaCl	280 mM	1,64 g	
Na ₂ HPO ₄	1,5 M	21 mg	
H ₂ O		ad 100 mL	

Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 N NaOH und 1 N HCl auf pH 7,05 eingestellt. (Für diese Methode ist es wichtig, dass der pH-Wert sehr exakt eingestellt war.) Die Lösung wurde durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert und in Aliquots von 10 mL bei -20 °C gelagert.

Transfektionsansatz/ Transfektion

Plasmid	1 µg		
H ₂ O		ad 67,5 µL	
Calciumchlorid-Lösung	100 mM	7,5 µL	2 M
HEPES-Puffer	1x	75 µL	2x

Die Reihenfolge der Zugabe muss strikt eingehalten werden, da sich sonst Calciumphosphat-Präzipitate bilden, ohne die DNA gebunden zu haben. Nach 20 min Inkubation bei RT (Trübung der Lösung) kann die Transfektion erfolgen.

3.3.3 Die Transfektion von Hepatozyten

Der Transfektionsansatz wurde in Polystyrolröhrchen angesetzt und durch leichtes Schwenken gemischt. Isolierte Hepatozyten (3.1) wurden mit M199 Transfektionsmedium auf auf $0,46 \times 10^6$ Zellen/ mL verdünnt. Je 1,5 mL Zellsuspension wurden auf nicht-collagenierte Kulturschalen (Nunc, $8,7 \text{ cm}^2$) pipettiert. Jeweils 150 μL des Transfektionsansatzes wurden auf die frisch ausplattierte Hepatozytensuspension getropft und vorsichtig gemischt. Im Anschluss wurden die Kulturschalen für 5 h im Brutschrank bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ unter 3 % CO_2 inkubiert. Nach dem ersten Mediumwechsel wurden die Hepatozyten, wenn nicht anders angegeben, wie unter 3.2.4 beschrieben, weiterbehandelt.

BIOCHEMISCHE METHODEN

3.4 Die Präparation von Mikrosomen der Ratte

Die Mikrosomen wurden durch Differentialzentrifugation präpariert.

3.4.1 Puffer und Lösungen

Der pH-Wert wurde, wenn nicht anders angegeben mit 1 N NaOH und 1 N HCl eingestellt.

Proteasen-Hemmstoffmischung

Pefabloc	200 mM	46 mg
Leupeptin	1 % (w/v)	10 mg
Trypsin-Inhibitor	1 % (w/v)	10 mg

Die Proteaseinhibitoren wurden getrennt in je 1 mL H_2O gelöst, und in Aliquots bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

KBS-Puffer

KCl	110 mM	2050 mg
NaH_2PO_4	10 mM	325 mg
Na_2HPO_4	10 mM	425 mg
EDTA	5 mM	365 mg
NaF	50 mM	525 mg
H_2O		ad 250 mL

Der pH wurde auf 7,4 eingestellt. Die Pufferlösung wurde bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Vor Gebrauch wurden pro mL Puffer frisch zugesetzt:

Pefabloc	200 μ M	1 μ L	200 mM Stlsg.
Leupeptin	10 μ g / mL	1 μ L	10 mg / mL Stlsg.
Trypsin-Inhibitor	10 μ g / mL	1 μ L	10 mg / mL Stlsg.

Kaliumphosphat-Pufferstammlösungen

KH ₂ PO ₄	0,5 M	68,05 g	
H ₂ O		ad 1000 mL	

K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	0,5 M	114,1 g	
H ₂ O		ad 1000 mL	

Kaliumphosphat-Puffer 0,5 M

KH ₂ PO ₄	0,5 M	150 mL	0,5 M Stlsg.
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	0,5 M	ad 850 mL	0,5 M Stlsg.

Durch das Mischen beider Lösungen im Verhältnis 1:4,7 stellt sich pH 7.4 ein.

Mikrosomen-Puffer

Kaliumphosphat-Puffer	100 mM	50 mL	
EDTA	1 mM	73 mg	
NaF	5 mM	52,5 mg	
Glycerol	20 % (v/v)	50 mL	
H ₂ O		ad 250 mL	

Der pH wurde mit auf 7,4 eingestellt. Die Pufferlösung wurde bei 4 °C aufbewahrt.

SDS-Lösung 5% (w/v)

SDS	5 % (w/v)	5 g	
H ₂ O		ad 100 mL	

Die Lösung wurde bei RT gelagert.

SDS-Lösung 1 % (w/v)

SDS	1 % (w/v)	1 g	
H ₂ O		ad 100 mL	

Die Lösung wurde bei RT gelagert.

NaOH-Lösung

NaOH	0,8 M	3,2 g
H ₂ O		ad 100 mL

Die Lösung wurde bei RT gelagert.

Lösung A

CuSO ₄ x 5 H ₂ O		0,1 g
Kaliumnatriumtartrat		0,2 g
C ₄ H ₄ KNaO ₆ x 4 H ₂ O		
H ₂ O		ad 40 mL

Die Lösung wurde bei RT gelagert.

Lösung B

Na ₂ CO ₃		1 g
H ₂ O		ad 40 mL

Die Lösung wurde bei RT gelagert.

Kupfertartrat-Lösung

Lösung A		40 mL
Lösung B		40 mL
H ₂ O		ad 100 mL

Die Lösungen unter Rühren mischen. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

LOWRY-Reagenz

Kupfertartrat-Lösung		2,5 mL	
SDS-Lösung 5 % (w/v)	2,5 %	5 mL	5 % (w/v)
NaOH-Lösung	0,2 M	2,5 mL	0,8 M

Die Lösung wurde vor der Messung frisch angesetzt.

Folin-Reagenz

Folin-Ciocalteu's	0,4 M	30 mL	2 M
Phenolreagenz			
H ₂ O		ad 150 mL	

Die Lösung wurde bei RT gelagert.

BSA-Standard

BSA	0,1 % (w/v)	10 mg
H ₂ O		ad 10 mL

Der BSA-Standard wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert.

3.4.2 Die Mikrosomenpräparation

Die Aufbereitung der bei -70 °C gelagerten Zellkulturversuche erfolgte bei 4 °C. Nach Zugabe von 300 µL KBS-Puffer mit Protease-Inhibitoren / Kulturschale wurden die Zellen abgeschabt und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde 20 s sonifiziert (Einstellung: Power 40% (Amplitude), Cycle 6 (Puls: 0,6 s Arbeit, 0,4 s Ruhe); maximale Frequenz 20 kHz; Leistung: 70 W) und anschließend bei 2500 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert (SIGMA 1215/4-H Rotor, SIGMA 3K30 Zentrifuge). Die Überstände wurden nochmals bei 20000 rpm (36 700 x g, SIGMA 1215/4-H Rotor, SIGMA 3K30 Zentrifuge) und 4 °C für 2 h zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde mit Hilfe einer Pipette durch mehrmaliges Aufziehen und Ausblasen in 100 µL Mikrosomen-Puffer resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nach dem Auftauen erneut resuspendiert. Direkt im Anschluss erfolgte die fluorometrische Messung der CYP2B1-spezifischen 7-Pentoxyresorufindepentylisierung nach BURKE (3.6). Dann wurde der Proteingehalt der Mikrosomensuspension nach LOWRY (3.4.3) bestimmt und die Suspension bei -70 °C gelagert.

3.4.3 Die Proteinbestimmung nach Lowry *et al.* (1951)

Die Proteinbestimmung nach LOWRY (1951) beruht darauf, daß die Proteine zunächst mit einem alkalischen Cu²⁺-Reagenz eine dem Biuret-Komplex ähnliche Verbindung eingehen. In einem nachfolgenden Reaktionsschritt erfolgt die Reduktion des Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenzes (Folin-Reagenz) durch die mit dem Cu²⁺ komplexierten Proteine. Der Kupfer-Protein-Komplex bewirkt die Reduktion von Molybdat bzw. Wolframat, die in Form von Heteropolyphosphorsäuren vorliegen. Die Reduktion des Folin-Reagenzes erfolgt, nachdem vermutlich Cu²⁺ im Kupfer-Protein-Komplex zu Cu⁺ reduziert wird. Die aromatischen Aminosäurereste Tyrosin und Tryptophan reduzieren darüber hinaus das Folin-Reagenz direkt ohne vorherige Komplexierung mit dem alkalischen Cu²⁺-Reagenz. Für die Bestimmung des Proteingehaltes der Mikrosomen in der Mikrotiterplatte wurden die Proben zunächst mit 1 % SDS-Lösung 1:100 verdünnt. Davon wurden 100 µL pro Well pipettiert und mit 100 µL LOWRY-Reagenz versetzt. Als Eichreihe dienten 0, 2, 4, 6, 8 und 10 µg BSA. Nach 15 Minuten wurde die Reaktion mit 50 µL Folin-Reagenz gestartet. Es entwickelte sich innerhalb von 30 Minuten eine Grün-Blau-Färbung, die mindestens 1 h stabil war und bei 750 nm photometrisch quantifiziert werden konnte.

3.5 Die Präparation von Zelllysaten aus Hepatocyten der Ratte

3.5.1 Puffer und Lösungen

Der pH-Wert wurde, wenn nicht anders angegeben mit 1 N NaOH und 1 N HCl eingestellt und neben unter 3.4.1 aufgeführten Puffern und Lösungen wurden folgende verwendet.

Natriumorthovanadat (Phosphatase-Inhibitor)

Na ₃ VO ₄	200 mM	36,8 mg
H ₂ O		ad 1 mL

Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 10,0 eingestellt. Zur Aktivierung wurde die Lösung so lange auf Siedetemperatur erhitzt und wieder abgekühlt, bis ihre Farbe von gelblich nach farblos umschlug. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Lysispuffer

Tris/HCl (pH 7,5)	20 mM	4 mL	1 M Stlsg.
NaCl	150 mM	1,752 g	
EDTA	1 mM	400 µL	0,5 M Stlsg.
EGTA	1 mM	76 mg	
Triton X-100	1 % (v/v)	2 mL	
Natriumpyrophosphat	2,5 mM	233 mg	
β-Glycerolphosphat	1 mM	43 mg	
NaF	50 mM	420 mg	
H ₂ O		ad 200 mL	

Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 7,5 eingestellt. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

Vor Gebrauch wurden dem Lysispuffer pro mL frisch zugesetzt:

Pefablock	200 µM	1 µL	200 mM Stlsg.
Leupeptin	10 µg/ mL	1 µL	10 mg/ mL Stlsg.
Trypsin-Inhibitor	10 µg/ mL	1 µL	10 mg/ mL Stlsg.
Na ₃ VO ₄	1 mM	5 µL	200 mM Stlsg.

Bradford-Reagenz

Serva Blue (Nr.35050)	0,01 % (w/v)	100 mg
Ethanol (95 %)	4,75 % (v/v)	50 mL
Phosphorsäure (85 %)	8,5 % (v/v)	100 mL
H ₂ O		ad 1000 mL

Die Lösung wurde durch einen Faltenfilter filtriert und bei RT gelagert.

3.5.2 Die Herstellung von Zelllysaten aus Hepatozyten der Ratte

Die Hepatozyten wurden wie unter 3.2.4 beschrieben behandelt und bei -70 °C gelagert. Alle Aufarbeitungsschritte erfolgen bei 4 °C. Zunächst wurden zu jeder Zellkulturschale 100 µL Lysispuffer mit Natriumorthovanadat und Proteaseinhibitoren gegeben. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt und die Lysate in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt. Zum besseren Zellaufschluss wurde die Zellsuspension für 10 s mit Ultraschall homogenisiert (Bandelin; Einstellung: Power 55% (Amplitude), Cycle 5 (Puls: 0,5 s Arbeit, 0,5 s Ruhe); maximale Frequenz 20 kHz; Leistung: 70 W). Dann wurden die Zelllysate für 15 min bei 10.000 x g zentrifugiert (SIGMA 3K30 Zentrifuge, Rotor SIGMA 1215/4-H) und der Überstand in neue 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt. Diese Zelllysate wurden bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach der Methode nach BRADFORD.

3.5.3 Die Proteinbestimmung nach BRADFORD *et al.* (1976)

Bei der Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) in der Mikrotiterplatte wurden die Proben zunächst mit H₂O 1:40 verdünnt. Davon wurden 10 µL pro Well pipettiert und mit 200 µL BRADFORD-Reagenz versetzt. Als Eichreihe dienten 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 µg BSA. Es entwickelte sich innerhalb von Minuten eine Blau-Grau-Färbung, die mindestens 1 h stabil war und durch Messung der Absorption bei 595 nm im Plattenphotometer (Fluostar Optima, BMG) photometrisch quantifiziert werden konnte.

3.6 Die fluorenspektrometrische Bestimmung der Cytochrome P450 2B 7-Pentoxyresorufin-O-Depentylase-Aktivität in Mikrosomen

3.6.1 Puffer und Lösungen

Neben unter 3.4.1 aufgeführten Puffern und Lösungen wurden folgende verwendet.

Natriumcitrat-Stammlösung

Natriumcitrat (tribasisch)	50 mM	147 mg
H ₂ O		ad 10 mL

Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

7-Pentoxyresorufin-Stammlösung 2 mM

7-Pentoxyresorufin wurde in Methanol gelöst und bei -20 °C gelagert.

Resorufin-Stammlösung 4,25 mM

Resorufin wurde in Methanol gelöst und bei -20 °C gelagert.

Kaliumphosphat-Puffer 0,05 M

Kaliumphosphat-Puffer 0,5 M	0,05 M	5 mL	
H ₂ O		ad 50 mL	

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

Resorufin-Standard

Resorufin	0,5 µM	1,2 µL	4,25 mM Stlsg.
Kaliumphosphat-Puffer		ad 10 mL	0,05 M

Der Standard wurde direkt vor Versuchsbeginn hergestellt und auf 37 °C erwärmt.

Co-Faktoren-Stammlösung (20x)

NADP+	1,3 mM	200 mg	
Glucose-6-phosphat	3,3 mM	200 mg	
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	3,3 mM	133 mg	
H ₂ O		ad 10 mL	

Die Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Stammlösung (100x)

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	40 U/ mL	400 U	
Natriumcitrat (tribasisch)	5 mM	1 mL	50 mM Stlsg.
H ₂ O		ad 10 mL	

Die Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Reaktions-Puffer (pro 96-Well Ansatz)

Co-Faktoren-Stlsg.		1 mL	
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Stlsg.		200 µL	
Kaliumphosphat-Puffer		ad 10 mL	0,05 M

Der Puffer wurde direkt vor Versuchsbeginn hergestellt und auf 37 °C erwärmt.

7-Pentoxyresorufin-Puffer (pro 96-Well Ansatz)

7-Pentoxyresorufin-Stlsg.	10 μ M	40 μ L	2 mM
Kaliumphosphat-Puffer		ad 8 mL	0,05 M

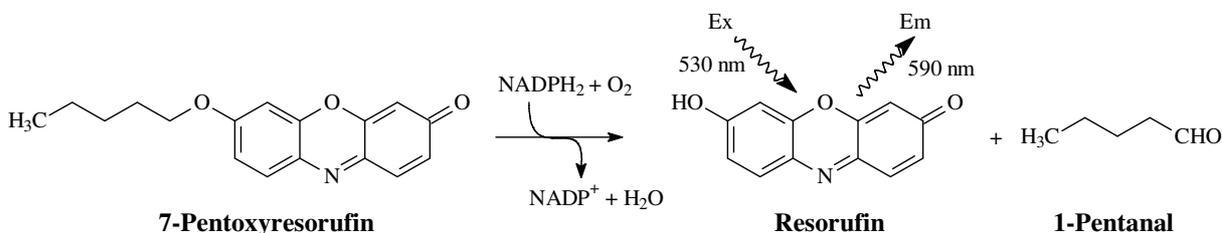
Der Puffer wurde direkt vor Versuchsbeginn hergestellt und auf 37 °C erwärmt.

3.6.2 Die fluoreszenzspektrometrische Messung in MikrosomenDie Resorufin-Standardreihe

Ausgehend von dem 0,5 μ M Resorufin-Standard wurden in die Vertiefungen A1 bis A10 100 μ L folgender Eichreihe pipettiert: 500; 400; 300; 250; 200; 150; 125; 100; 75 und 50 nM Resorufin. Die Vertiefungen A11 und A12 enthielten nur das Lösungsmittel 50 mM Kaliumphosphat Puffer.

Die Versuchsreihe

In die Vertiefungen einer schwarzen Mikrotiterplatte wurden 10 μ L der Mikrosomenpräparationen und 90 μ L des 7-Pentoxyresorufin-Puffers pipettiert. Der Start und die fluorometrische Messung der 7-Pentoxyresorufin-depentylierung erfolgten im Fluostar Optima (BMG) bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch automatische Zugabe von 100 μ L des Reaktionspuffers gestartet. Die Excitation erfolgte bei $\lambda=530$ nm, die Emission wurde bei $\lambda=590$ nm gemessen. Die Resorufinbildung wurde kontinuierlich über einen Zeitraum von 20 min aufgenommen.

Die Auswertung

Die Auswertung erfolgte durch ein von BMG mitgeliefertes auf Excel basierendes Programm, unter Einbeziehung der Standardreihe und der Proteinmenge. Die Aktivität wurde in pmol Resorufin/ mg Protein* min errechnet und das prozentuale Verhältnis zur Kontrollaktivität bestimmt. Die statistische Analyse erfolgte mittels des zweiseitigen Student's t-test für gepaarte Proben.

3.7 Der immunologische Nachweis von Cytochrom P450 2B in Mikrosomen und CAR in Zelllysaten durch Westernblot-Analyse

3.7.1 Puffer und Lösungen

Der pH-Wert wurde, wenn nicht anders angegeben mit 1 N NaOH und 1 N HCl eingestellt.

Tris/HCl-Stammlösung

Tris	1M	121,1 g
H ₂ O		ad 1000 mL

Der pH-Wert wurde je nach Gebrauch mit HCl auf 6; 7,5 oder 8,5 eingestellt.

SDS-Stammlösung 20 % (w/v)

SDS	20 % (w/v)	20 g
H ₂ O		ad 100 mL

SDS-Stammlösung 10 % (w/v)

SDS	10 % (w/v)	10 g
H ₂ O		ad 100 mL

Die Lösungen wurden bei RT gelagert.

4 x SDS-Probenpuffer

Tris/HCl	320 mM	1 mL	1 M Stlsg. pH 6
SDS	8 % (w/v)	20 mL	20 % (w/v) Stlsg.
Glycerol	20 % (w/v)	11,48 mL	87 % (w/v)
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)	52 mg	
H ₂ O		ad 50 mL	

Sammelgelpuffer

Tris	0,5 M	50 mL	1 M Stlsg.
SDS	0,4 % (w/v)	4 mL	10 % (w/v) Stlsg.
H ₂ O		ad 100 mL	

Der Puffer wurde mit HCl auf pH 6,8 eingestellt und bei 4 °C gelagert.

Trenngeluffer

Tris	1,5 M	18,17 g	
SDS	0,4 % (w/v)	4 mL	10 % (w/v) Stlsg.
H ₂ O		ad 100 mL	

Der Puffer wurde mit 12 N HCl auf pH 8,8 eingestellt und bei 4 °C gelagert.

30 % (w/v) Acrylamid-Stammlösung

Die Lösung wurde fertig von Roth gekauft und bei 4 °C gelagert.

Elektrophorese-Laufpuffer

Tris	25 mM	15,45 g	
Glycin	191 mM	72,05 g	
SDS	0,1 % (w/v)	5 mL	10 % (w/v) Stlsg.
H ₂ O		ad 5000 mL	

Blottransferpuffer A

Tris	300 mM	300 mL	1 M Stlsg.
SDS	0,1 % (w/v)	10 mL	10 % (w/v) Stlsg.
Methanol	20 % (v/v)	200 mL	
H ₂ O		ad 1000 mL	

Der Puffer mit dem pH Wert von 11,5 wurde bei RT gelagert.

Blottransferpuffer B

Tris	25 mM	25 mL	1 M Stlsg.
SDS	0,1 % (w/v)	10 mL	10 % (w/v) Stlsg.
Methanol	20 % (v/v)	200 mL	
H ₂ O		ad 1000 mL	

Der Puffer mit dem pH Wert von 10,5 wurde bei RT gelagert.

Blottransferpuffer C

Tris/Borat	25 mM	25 mL	1 M Stlsg.
SDS	0,1 % (w/v)	10 mL	10 % (w/v) Stlsg.
Methanol	20 % (v/v)	200 mL	
H ₂ O		ad 1000 mL	

Der Puffer wurde mit 1 M Borsäure auf pH 9,0 eingestellt und bei RT gelagert.

Ponceau S Färbelösung

Ponceau S	0,25 % (w/v)	2,5 g
Methanol	40 % (v/v)	400 mL
Essigsäure	15 % (v/v)	150 mL
H ₂ O		ad 1000 mL

Die Lösung wurde durch einen Faltenfilter filtriert und war mindestens 12 Monate verwendbar.

10x TBS-Puffer

Tris	0,20 M	24,2 g
NaCl	1,36 M	80,0 g
H ₂ O		ad 1000 mL

Der pH-Wert wurde mit 1 N HCl auf 7,6 eingestellt. Der Puffer wurde bei RT gelagert.

TBS-Tween-Waschpuffer

10x TBS	1x	100 mL	
Tween	0,1 % (v/v)	5 mL	20%(v/v) Stlsg.
H ₂ O		ad 1000 mL	

Der Puffer wurde bei RT gelagert.

Blockierungslösung I

BSA	5 % (w/v)	500 mg
TBS-Tween-Waschpuffer		ad 10 mL

Die Lösung wurde frisch angesetzt.

Blockierungslösung II

Magermilchpulver	5 % (w/v)	5 g
TBS-Tween-Waschpuffer		ad 100 mL

Die Lösung wurde frisch angesetzt.

SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate

Die beiden Nachweislösungen "Luminol/Enhancer Solution" und "Stable Peroxide Solution" wurden ohne Angaben des Herstellers (PIERCE) geliefert.

3.7.2 Die Vorbereitung der Proben für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Jeder Ansatz wurde mit 15 µL 4 x Probenpuffer (+ 20 % β-Mercaptoethanol) versetzt, die Ansätze für 5 min auf 95 °C erhitzt und dann für 5 min bei 13 000 rpm (16 000 x g) in der

Biofuge pico zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben auf das Polyacrylamidgel aufgetragen.

3.7.3 Die Vorbereitung der Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE

Zur analytischen Trennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichtes wurden diskontinuierliche Polyacrylamidgele nach LAEMMLI (1970) eingesetzt. Die verwendeten Gele hatten eine Stärke von 1,0 mm und eine Abmessung von 8,5 x 5,5 cm. Die Gele wurden mit dem Elektrophorese-System Mini Protean II (BioRad) gegossen und betrieben. Die Glasplatten wurden mit Aceton gereinigt und mit zwei Abstandhaltern zwischen den Platten zusammengesetzt und abgedichtet. Das Trenngel für die Cytochrome P450 2B und CAR-Bestimmung enthielt 10 % (w/v) Polyacrylamid (PAA). Die Gele wurden wie folgt gegossen.

<u>Trenngel</u>	10 % (w/v) PAA
Acrylamid (30 % ,37,5:1, 0,8 % Bisacrylamid)	3,00 mL
H ₂ O	3,75 mL
Trenngelpuffer	2,25 mL
Ammoniumpersulfat (10 % (w/v) Stlsg.)	75 µL
TEMED	15 µL

Die einzelnen Komponenten wurden gemischt und bis zu einer Höhe von 5,5 cm zwischen die Glasplatten gefüllt. Zur Glättung der Oberfläche wurde das Gel daraufhin mit H₂O gesättigtem n-Butanol überschichtet. Nachdem das Trenngel vollständig polymerisiert war, wurde das n-Butanol entfernt und die Geloberfläche vorsichtig mit einem Filterpapier getrocknet. Anschließend wurde das Sammelgel wie folgt gegossen:

<u>Sammelgel</u>	4,45 % (w/v) PAA
Acrylamid (30 % ,37,5:1, 0,8 % Bisacrylamid)	0,50 mL
H ₂ O	2,00 mL
Sammelgelpuffer	833 µL
Ammoniumpersulfat (10 % (w/v) Stlsg.)	25 µL
TEMED	5 µL

Die Lösungen wurden gemischt, bis zum oberen Rand zwischen die Glasplatten gefüllt und der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach 20 min wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt, diese mit Elektrophorese-Laufpuffer gefüllt, der Probenkamm unter Flüssigkeit entfernt und die Luftblasen weggespült.

3.7.4 Die Trennung der Proteine durch SDS-PAGE

Die aufbereiteten Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Als Molekulargewichts-Standard dienten 15 µL des LMW-Markers (MBI Fermentas). Die Elektrophorese erfolgte mit 15 mA/ Gel im Sammelgel und mit 20 mA/ Gel im Trenngel. Sie wurde beendet, wenn die Bromphenolblaubande den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte.

3.7.5 Der Transfer der getrennten Proteine auf PVDF-Membranen durch Western-Blot

Nach der Gelelektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt, die linke obere Ecke des Trenngels zur Markierung entfernt und das Gel für 15 min in Blottransferpuffer C äquilibriert. Währenddessen wurden eine PVDF-Membran und vier Whatman-Filter (3 mm) auf das entsprechende Gelmaß (8,5 x 5,5 cm) zugeschnitten und die linke obere Ecke der Membran ebenfalls markiert. Nachfolgend wurde die PVDF-Membran kurz in reinem Methanol geschwenkt, wodurch sie gleichmäßig angefeuchtet wurde. Danach wurde die Membran 2 min in Wasser gespült und anschließend in Blottransferpuffer B für 15 min äquilibriert. Der Blotaufbau wurde auf der Anodenplatte der Blotvorrichtung durchgeführt. Es musste darauf geachtet werden, die einzelnen Schichten möglichst luftblasenfrei aufzulegen. Zuerst wurde ein Filterpapier in Blottransferpuffer A angefeuchtet und aufgelegt. Darauf wurde ein zuvor mit Blottransferpuffer B benetztes Filterpapier gelegt. Auf die beiden Filter wurde die PVDF-Membran und auf diese dann das Polyacrylamidgel aufgelegt, so dass die beiden markierten Ecken übereinander lagen. Abschließend wurden zwei zuvor in Blottransferpuffer C angefeuchtete Filter auf das Gel geschichtet und der Aufbau mit einem Glasröhrchen komprimiert, um eventuell noch vorhandene Luftblasen und überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Zum Abschluss wurde die Kathodenplatte aufgelegt. Der Transfer erfolgte bei konstanter Stromstärke von 1,2 mA/cm² Gelfläche über einen Zeitraum von 45 min.

3.7.6 Der Nachweis der geblotteten Proteine durch Ponceau-S-Färbung

Nach Ablauf der Transferzeit wurde der Blotaufbau abgebaut, die PVDF-Membran mit einer Pinzette entnommen und in eine Schale mit Ponceau-S-Färbelösung für die reversible Proteinfärbung gelegt. Die Membran wurde einige Minuten angefärbt und anschließend mit Wasser gespült, bis die Hintergrundfärbung verschwunden war. Anschließend wurden die Banden des Molekulargewichtstandards und die Proteinspuren mit Nadelstichen markiert und die Membran in TBS-Tween-Waschpuffer entfärbt, wobei je nach Intensität der Färbung ein oder mehrere Pufferwechsel nötig waren.

3.7.7 Der immunologische Nachweis von Cytochrom P450 2B bzw. CAR durch Immunperoxidase-Färbung der geblotteten Proteine

Zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran für eine Stunde bei RT in Blockierungslösung II geschwenkt. Danach wurde die Membran dreimal 15 min mit TBS-Tween-Waschpuffer gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit dem CYP2B-Antikörper (monoklonaler Maus-Anti-Ratte-IgG, der Hersteller machte keine Angaben über die Konzentration) 1:100 in TBS-Tween-Waschpuffer mit 5 % (w/v) BSA oder 0,33 µg CAR-Antikörper (polyklonaler Kaninchen-Anti-Maus-IgG 200 µg IgG/ mL)/ mL TBS-Tween-Waschpuffer mit 5 % Milchpulver inkubiert. Die Membran wurde wiederum dreimal 15 min mit TBS-Tween-Waschpuffer gewaschen und anschließend 1 h mit Peroxidase-gekoppeltem Ziege-Anti-Maus-Antikörper bzw. Peroxidase-gekoppeltem Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper 1 : 10 000 in TBS-Tween-Waschpuffer mit 5 % (w/v) Milchpulver inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal 15 min mit TBS-Tween-Waschpuffer gewaschen. Der Nachweis wurde durch eine Chemilumineszenz-Reaktion mit dem Chemilumineszenz-Substrat (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate) der Firma Pierce nach Anweisung des Herstellers abgeschlossen. Dazu wurden Lösungen 1 und 2 zu gleichen Teilen zu einem Endvolumen von 1 mL/ PVDF Membran gemischt und auf die PVDF-Membran aufgetropft. Die Membran wurde 5 min in der Lösung inkubiert, in Frischhaltefolie eingelegt und überschüssige Flüssigkeit bzw. Luftblasen mit einem Glasröhrchen entfernt. Die entstandene Chemilumineszenz wurde direkt mit Hilfe des "ChemiDoc™-System" (BioRad) detektiert und die spezifischen Banden (CYP2B~54 kDa, CAR~39 kDa) mit dem Software-Programm „Quantity One“ (BioRad) quantifiziert.

3.8 Der Nachweis der Luciferase-Reportergenaktivität

3.8.1 Das Prinzip

Das verwendete ‚Luciferase Assay System‘ der Firma Promega ermöglichte den Nachweis des Enzyms Luciferase aus der nordamerikanischen Feuerfliege (*Photinus pyralis*) in mit einem Luciferase-Reportergenvektor transfizierten Zellen. Das Luciferase-Enzym setzt unter ATP-Verbrauch und in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen das Substrat Luciferin in einen Luciferase-Luciferyl-AMP-Komplex um. Dieser Komplex wird unter Emission von Licht oxidativ zu Luciferase, Oxyluciferin, AMP, Pyrophosphat sowie CO_2 decarboxyliert. Wenn Luciferin im Überschuss zur Verfügung steht, ist die Lichtemission proportional zur Luciferasekonzentration und kann im Luminometer quantifiziert werden. Die so in Zellextrakten transfizierter Zellen quantifizierte Menge Luciferase erlaubt damit Rückschlüsse auf die Aktivität und Stärke des Promotors transfizierter Plasmide, die ein Luciferase-Reportergen tragen.

3.8.2 Puffer und Lösungen

Luciferase-Zellkultur-Lysispuffer (1x)

Tris (pH 7,8)	25 mM
DTT	2 mM
1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'.-Tetraacetat	2 mM
Glycerol	10 % (v/v)
Triton X-100	1 % (v/v)

Der Zellkultur-Lysispuffer war dem Kit als 5x Konzentrat beigelegt und wurde bei -20 °C gelagert. Vor Gebrauch wurde er mit H₂O auf 1x Lysispuffer verdünnt.

Luciferase Assay-Substrat

Das Substrat wurde vom Hersteller mitgeliefert, die Zusammensetzung wurde nicht bekannt gegeben. Das Substrat wurde durch Zugabe von 10 mL Luciferase Assay-Puffer rekonstituiert und in Aliquots von 10 mL unter Lichtabwesenheit bei -20 °C gelagert.

Luciferase Assay-Puffer

Der Puffer wurde vom Hersteller mitgeliefert, die Zusammensetzung wurde nicht bekannt gegeben.

3.8.3 Die Durchführung des Luciferase-Assays

Die bei -70 °C gelagerten transfizierten Hepatozyten (3.3.3) wurden auf eiskalten Platten mit 100 µL Luciferase-Zellkultur-Lysispuffer überschichtet, mit Hilfe eines Zellschabers lysiert und in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden diese 30 min auf Eis inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation (Biofuge pico, 1 min bei 13.000 rpm (16.060 x g)) wurden je 25 µL des Zellüberstandes in eine Vertiefung einer 96 well-Platte (Fluoro MaxiSorp von Nunc™) gegeben und die Platte im Messgerät Fluostar Optima (BMG) gemessen. Durch einen Injektor wurden 25 µL des Luciferase Assay-Substrates zu jeder Vertiefung gegeben und das produzierte Licht über einen Zeitraum von 10 s von einem Detektor gemessen.

MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.9 Die Isolierung von Gesamt-RNA mit Hilfe des Kits "SV Total RNA Isolierungs-System" aus Hepatozyten der Ratte

3.9.1 Puffer und Lösungen

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mit dem Kit „SV Total RNA Isolierungs-System“ von Promega. Die darin enthaltenen Puffer und Lösungen wurden, wenn nötig, mit β -Mercaptoethanol oder Ethanol (95 % (v/v)) versetzt und wenn nicht anders beschrieben bei RT gelagert.

Yellow Core-Puffer

Tris (pH 7,5)	0,0225 M
NaCl	1,125 M
Yellow Dye	0,0025 % (w/v)

RNA-Lysispuffer

Guaninisothiocyanat	4 M
Tris (pH 7,5)	0,01 M
β -Mercaptoethanol	0,97 % (v/v)

β -Mercaptoethanol wurde nach Angaben des Herstellers zugesetzt und die Lösung dann bei 4 °C gelagert.

DNase-Stopplösung

Tris-HCl (pH 7,5)	4 mM
Ethanol (95 % (v/v))	57 % (v/v)

Ethanol wurde nach Angaben des Herstellers zugesetzt.

RNA-Waschlösung

Kaliumacetat	60 M
Tris-HCl (pH 7,5 bei 25 °C)	10 mM
Ethanol (95 % (v/v))	60 % (v/v)

Ethanol wurde nach Angaben des Herstellers zugesetzt.

DNase I

Die DNase I war dem Kit in lyophilisierter Form beigelegt und wurde in 285 μ L Nuclease-freiem Wasser gelöst. Die Lösung wurde dann bei -20 °C gelagert.

RNA-Dilutions-Puffer (Puffer Blue), MnCl₂ (0,09 M), Nuclease-freies Wasser

Die Lösungen waren dem Kit ebenfalls beigelegt. Über die Zusammensetzungen machte der Hersteller keine Angaben.

DEPC-H₂O

DEPC	0,1 % (v/v)	1 mL/ L
------	-------------	---------

Reinst-Wasser wurde mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzt und für 12-14 h bei 37 °C inkubiert, um RNasen vollständig zu inaktivieren. Das verbliebene DEPC wurde durch Autoklavieren zersetzt. Alle Puffer und Lösungen für die RNA-Isolierung wurden mit DEPC- H₂O angesetzt, um den Abbau von RNA durch exogene RNasen zu verhindern.

3.9.2 Die Isolierung von Gesamt-RNA mit Hilfe des SV Total RNA Isolierungs-Systems der Firma Promega

Die Hepatozyten (3.2.4) wurden bei 4 °C lysiert. Jeweils 1 Kulturschale (28,3 cm²) wurde dazu mit insgesamt 175 µL RNA-Lysispuffer versetzt, die Zellen abgeschabt und das Zelllysat in ein autoklaviertes 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Dann wurde die RNA nach Anweisung des Herstellers isoliert. Ein Aliquot der RNA wurde 1:100 mit DEPC-H₂O verdünnt. Die Extinktion dieser verdünnten RNA-Lösung wurde bei 260 nm (RNA) und 280 nm (Proteine) gemessen, um so Konzentration und Reinheit der RNA-Lösung zu bestimmen. Es wurde nur RNA verwendet, deren Quotient 260 nm / 280 nm > 1,7 war. Die RNA-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{RNA-Konzentration [ng/}\mu\text{L]} = \Delta E \text{ 260 nm} \times \text{Verdünnung} \times 40 \text{ ng/}\mu\text{L}.$$

Die RNA wurde bei -70 °C gelagert.

3.10 Der Nachweis von CAR- bzw. CPT1-mRNA mit Hilfe der „Real-Time“-quantitativen-PCR in Hepatozyten der Ratte

3.10.1 Puffer und Lösungen

5x RT-Puffer (MBI-Fermentas)

Tris-HCl	250 mM
KCl	250 mM
MgCl ₂	20 mM
DTT	50 mM

Die Lösung hatte einen pH-Wert von pH 8,3 und war der RevertAid™ H Minus M-MuLV Reversen Transkriptase beigelegt. Sie wurde bei -20 °C gelagert.

Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) (10 mM, 2 mM, MBI-Fermentas)

dATP, dCTP, dGTP und dTTP standen in einer Konzentration von 100 mM zur Verfügung

10 mM dNTPs: Je 10 µL der dNTPs wurden mit 60 µL H₂O verdünnt.

2 mM dNTPs: Je 10 µL der dNTPs wurden mit 460 µL H₂O verdünnt.

Die Lösungen wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 ng/µL)

Oligo(dT) ₁₂₋₁₈	500 ng/µL	196 µg
----------------------------	-----------	--------

H ₂ O		392 µL
------------------	--	--------

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2x Puffer (iQTM SYBR[®] Green supermix, Bio-Rad)

Tris-HCl	40 mM
----------	-------

KCl	100 mM
-----	--------

MgCl ₂	6 mM
-------------------	------

DTT	50 mM
-----	-------

dNTP	400 µM
------	--------

iTaq DNA Polymerase	50 U/ mL
---------------------	----------

Fluorescein	20 nM
-------------	-------

Die Lösung hatte einen pH-Wert von pH 8,4 und enthielt außerdem SYBR[®] Green I und Stabilisatoren. Es wurden jedoch vom Hersteller keine Angaben zur Konzentration gemacht.

Der Puffer wurde bei -20 °C gelagert.

3.10.2 Die Synthese von cDNA-mRNA-Hybriden

Für die Synthese von cDNA-mRNA-Hybriden wurde die RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase verwendet. Hierbei handelt es sich um eine in *E. coli* vermehrte retrovirale Polymerase (*Moloney-Murine-Leukemia-Virus*) die in Gegenwart eines DNA-Oligonucleotids (Oligo(dT)₁₂₋₁₈) als Startermolekül (Primer) und einzelsträngiger RNA als Matrize, DNA synthetisiert. Für die cDNA-Synthese wurden 2,5 µg Gesamt-RNA eingesetzt, die mit DEPC- H₂O auf ein Gesamtvolumen von 12 µL aufgefüllt wurden. Zu dieser RNA-Lösung wurde 1 µL Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 µg/ mL) gegeben. Das Gemisch wurde für 5 min bei 70 °C zur Denaturierung von Sekundärstrukturen innerhalb der RNA inkubiert und danach in Eiswasser für 5 min schockgekühlt, um die Wiederausbildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Zum Ansatz wurden 4 µL 5 x RT-Puffer und 2 µL einer 10 mM dNTP-Lösung gegeben und das Gemisch 5 min bei 37 °C präinkubiert. Dann wurde 1 µL (200 U) der Reversen Transkriptase hinzugefügt. Die Hybridisierung des Oligo(dT)-Nukleotides mit dem

poly(A)-Schwanz der mRNA und nachfolgend die reverse Transkription wurden für 90 min bei 42 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Erhitzen des Ansatzes auf 70 °C für 10 min beendet. Die cDNA-mRNA-Hybride wurden bei -20 °C gelagert.

3.10.3 Die Protokolle für die *Real-Time*-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (RTQ-PCR) mit Hilfe des iCycler™

Bei der Real-Time-quantitative-PCR (RTQ-PCR) mit SYBR® Green I läuft im Grunde eine herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ab, die aufgrund des zugesetzten Fluoreszenzfarbstoffs SYBR® Green I einem asymmetrischen Cyanin-Farbstoff, der in der doppelsträngigen DNA interkaliert, zusätzlich die Möglichkeit zur Quantifizierung des PCR-Produkts während des PCR-Zyklus (*Real-Time*) bietet. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Spezifität, da *per se* zwischen verschiedenen PCR-Produkten nicht unterschieden werden kann. Jedoch kann man mit Hilfe einer abschließenden Schmelzkurvenanalyse die Fragmentlänge und damit die Spezifität bestimmen. Bei der Schmelzkurvenanalyse wird die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht wird (50 °C -> 95 °C). Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur wird der Doppelstrang wieder ein einzelsträngiges Molekül. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und es wird eine Fluoreszenzabnahme registriert. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist eine Unterscheidung möglich. Für eine quantitative Analyse der unbekanntenen cDNA-Proben werden parallel PCRs mit definierten Mengen von Standardvektoren (CAR bzw. β -Actin) als Probe durchgeführt. Dabei wird die definierte Kopienzahl im Anschluss in einer Standardkurve dem Fluoreszenzwert bei einem bestimmten Schwellenzyklus in der logarithmischen Phase gegenüber gestellt. Dadurch lässt sich die Ausgangskopienzahl von CAR bzw. β -Actin in der unbekanntenen Probe ermitteln. Die Kopienzahl von CAR wird dann um die Kopienzahl des „house keeping“ Gens β -Actin korrigiert.

PCR-Mix für eine Probe:

Puffer (iQ™ SYBR® Green supermix, Bio-Rad)	1x	10 μ L	2x
Sense-Oligonukleotid CAR, CPT1 oder β -Actin	0,5 μ M	1 μ L	10 μ M
Antisense-Oligonukleotid CAR, CPT1 oder β -Actin	0,5 μ M	1 μ L	10 μ M
cDNA-mRNA-Hybrid- oder Standard-Probe		5 μ L	
H ₂ O		ad 20 μ L	

PCR-Programm des iCycler™:

1. Initiale Denaturierung	3 min	95 °C
2. Denaturierung	30 s	95 °C
3. Anlagerung	30 s	63 °C
4. Verlängerung	1 min	72 °C
Zyklen	40x	2. - 4.

Bei der verwendeten „hot-start“ iTaq DNA Polymerase handelt es sich um ein thermostabiles Enzym, das aus *Thermus aquaticus* gereinigt wurde. Die cDNA-Stammlösungen wurden 1:10 für die CAR-RT-Q-PCR und 1:100 für die β -Actin-RT-Q-PCR verdünnt. Die Standards wurden wie unter 3.14 beschrieben, hergestellt. Verdünnungen der Vektoren mit folgenden Kopienzahlen wurden eingesetzt; pJetCAR: 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 und 10^6 Kopien/ 5 μ L; pUC57 β -Actin: 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 und 10^7 Kopien/ 5 μ L. Die PCR der unbekanntenen Proben erfolgte in Dreifach-, die der Standards in Doppelbestimmung im iCycler™ (Bio-Rad) für 40 Zyklen unter den oben aufgeführten Bedingungen. Im Anschluss jeder RT-Q-PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Anhand der Standardreihen ($R^2 > 0,95$) für CAR bzw. β -Actin wurden die Ausgangskonzentrationen der beiden mRNAs als Kopienzahl ermittelt. Die CAR-mRNA wurde um die β -Actin-mRNA korrigiert. Für die Analyse der CPT1-mRNA lagen keine Standards vor, hier wurde das Verhältnis zur β -Actin-mRNA anhand der $\Delta\Delta$ Ct-Methode bestimmt. Dabei wurde zunächst für jede Probe der Mittelwert der Schwellenzyklen des Kontrollgens (β -Actin) $MW(Ct_{Act})$ vom Mittelwert (MW) der Schwellenzyklen des zu untersuchenden Gens (CPT1) $MW(Ct_{CPT})$ subtrahiert (Δ Ct). Im nächsten Schritt wurden nun die Differenzen Δ Ct der behandelten Proben (WY 14643, PGD₂) mit den Δ Ct der Kontrollproben (DMSO) verglichen, indem Δ Ct_{DMSO} von Δ Ct_{Probe} subtrahiert wurde und als n-fache Expression der Kontrolle angegeben wurde.

$$n\text{-fache Expression} = 2^{-[(Ct_{CPT} - Ct_{Act})_{Probe} - (Ct_{CPT} - Ct_{Act})_{DMSO}]}$$

3.11 Der Nachweis von Acyl CoA Oxidase 1 (ACO1)- und CYP2B1-mRNA mit Hilfe der Northernblot-Analyse in Hepatozyten der Ratte

3.11.1 Puffer und Lösungen

Der pH-Wert wurde, wenn nicht anders angegeben mit 1 N NaOH und 1 N HCl eingestellt.

Ethanol 70 % (v/v) siehe 3.2.1

SDS-Lösung 10% (w/v) siehe 3.7.1

GTC-Puffer

Guanidiniumthiocyanat	4 M	50 g	
N-Laurylsarcosin	17 mM	1,67 g	30 % (w/v)
Trinatriumcitrat x 2 H ₂ O	0,02 M	0,75 g	
H ₂ O		ad 100 mL	

Die Substanzen wurden bei 50 °C in H₂O gelöst, der pH-Wert nach dem Abkühlen auf 7,5 eingestellt und die Lösung durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert. Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert. Unmittelbar vor Gebrauch wurden 100 mL GTC-Puffer mit 1 mL β-Mercaptoethanol versetzt.

Natriumacetat-Lösung

Natriumacetat	2 M	16,41 g	
H ₂ O		ad 100 mL	

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 4,0 eingestellt. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

20 x SSC (Standard-Saline-Citrat-Buffer)

NaCl	3 M	175,32 g	
Na-Citrat	0,3 M	88,23	
H ₂ O		ad 1000 mL	

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,0 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

5 x SSC

SSC	5 x	100 mL	20 x
H ₂ O		300 mL	

2 x SSC/SDS-Waschlösung

SSC	2 x	100 mL	20 x
SDS		10 mL	10 %
H ₂ O		ad 1000 mL	

1 x SSC/SDS-Waschlösung

SSC	1 x	50 mL	20 x
SDS		10 mL	10 %
H ₂ O		ad 1000 mL	

0,1 x SSC/SDS-Waschlösung

SSC	0,1 x	5 mL	20 x
SDS		10 mL	10 %
H ₂ O		ad 1000 mL	

Die Lösungen wurden bei RT gelagert.

Phenol (Roti-Aqua-Phenol)

Wassergesättigt. pH 4,5 – 5 (Roth). Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

10x MOPS

3-N-Morpholinopropan-sulfonsäure (MOPS)	0,2 M	41,86 g	
Natriumacetat	50 mM	4,1 g	
EDTA	10 mM	3,72 g	
H ₂ O		ad 1000 mL	

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt. Die Lösung wurde bei RT gelagert.

Chloroform-Isoamylalkohol (49:1)

Chloroform	98 mL
Isoamylalkohol	2 mL

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

Formamid dei (=deionisiert)

Formamid	50 mL
Ionenaustauscherharz (Serdolite)	5 g

Die Lösung wurde 30 min bei RT gerührt und in 10 mL Aliquots bei -20 °C gelagert.

Blaupuffer

Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	5 mM	8,9 mg	
Bromphenolblau	0,4 % (w/v)	40 mg	
Glycerin	6,84 M	5 mL	50 % (w/v)
H ₂ O		ad 10 mL	

Der pH-Wert wurde mit H₃PO₄ auf 7,0 eingestellt und die Lösung in 1 mL Aliquots bei RT aufbewahrt.

Isopropanol (Roth) Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

Formamid-Mix

Formamid dei		750 µL	16,5 M
MOPS	1,4x	150 µL	10x
Formaldehyd		240 µL	37% (w/v)

Die Lösung wurde frisch angesetzt.

Probenpuffer (50:250:1)

Blaupuffer		400 µL
Formamid-Mix		2 mL
Ethidiumbromid		8 µL

Die Lösung wurde frisch angesetzt.

100x Denhardt's-Lösung

Ficoll (400000)		2 g
Polyvinylpyrrolidon		2 g
BSA		2 g
H ₂ O		100 mL

Die Lösung wurde durch einen 0,4 µm Filter sterilfiltriert und in 3,6 mL Aliquots bei -20 °C gelagert.

T4-Polynukleotid-Kinase (Roche)

T4-Polynukleotid-Kinase	10 U/ µL
Tris-HCl	50 mM
EDTA	0,1 mM
DTT	1 mM
ATP	1 µM
Glycerol	50 % (v/v)

Die Lösung hatte einen pH-Wert von pH 7,5 und wurde bei -20 °C gelagert. 1U= 1 nMol [³²P] in 30 min bei 37 °C

EDTA-Lösung

EDTA	100 mM	3,722 g
H ₂ O		100 mL

Die Lösung wurde durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert bei RT gelagert.

10x Kinasepuffer (Roche)

Tris-HCl	500 mM
MgCl ₂	100 mM
EDTA	1 mM
DTT	50 mM
Spermidin	5 mM

Die Lösung hatte einen pH-Wert von pH 8,2 und war der T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/ μ L) beigefügt. Sie wurde bei -20 °C gelagert.

(γ -³²P) ATP

40 μ Ci (=1,5 MBq)

Heringsperma-DNA-Na-Salz (Roche): Fragmentlänge 1000- 3000 bp

Um Heringsperma- DNA der Fragmentlänge 400 - 500 bp zu erzielen, wurde 1g Heringsperma-DNA über Nacht in 100 mL 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) gelöst und in 25 mL Portionen 10 min auf Eis sonifiziert. Mit Hilfe einer Agarosegel -Elektrophorese (3.15) wurde die Fragmentlänge überprüft. 500 μ L Aliquots wurden bei -20 °C gelagert und direkt vor der Benutzung 10 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt

Prähybridisierungslösung

Formamid dei	5 mL	
SSC	3,6 mL	20x
Denhardt's-Lösung	0,5 mL	100x
SDS	0,5 mL	10 %
Heringsperma-DNA denat.	0,4 mL	

Die Lösung wurde direkt vor Gebrauch bei 38 °C hergestellt.

3.11.2 Die Isolierung von Gesamt-RNA mit Hilfe der Phenol/ Chloroform-Methode aus Hepatozyten der Ratte

Die Hepatozyten wurden in 500 μ L GTC-Puffer pro 28,3 cm² Platte lysiert, in RNase-freie verschließbare Zentrifugen-Röhrchen überführt und mit GTC-Puffer auf 3 mL aufgefüllt. Anschließend wurden nacheinander 300 μ L 2 M Natriumacetat-Lösung, 3 mL Phenol (H₂O-gesättigt) und 600 μ L Chloroform-Isoamylalkohol (49:1) zugegeben und die Proben jeweils kräftig geschüttelt. Dann wurden die Proben zur Phasentrennung 10 min auf Eis gelagert und 20 min bei 10000 rpm (SORVALL-Zentrifuge, Rotor SORVALL SS-34; 4 °C; 7500 x g) zentrifugiert. Die RNA befand sich in der oberen Phase. Diese wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Zentrifugen-Röhrchen überführt und mit 3 mL Isopropanol gemischt. Die RNA

wurde über Nacht bei -20 °C gefällt. Im Anschluss wurden die Proben 30 min bei 14000 rpm (SORVALL-Zentrifuge, Rotor SORVALL SS-34; 4 °C; 15000 x g) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden jeweils in 1,5 mL GTC-Puffer gelöst. Nach Zugabe von 1,5 mL Isopropanol wurde die RNA erneut über Nacht bei -20 °C gefällt. Die Proben wurden wiederum 30 min bei 14000 rpm (SORVALL-Zentrifuge, Rotor SORVALL SS-34; 4 °C; 15000 x g) zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Pellets zweimal mit 1 mL Ethanol (70%) gewaschen, getrocknet und in 40 µL nucleasefreiem H₂O gelöst. Die RNA-Konzentration wurde bestimmt (3.9.2) und die RNA bei -70 °C gelagert.

3.11.3 Die Auftrennung von RNA in Agarosegelen

Zunächst wurden die Geltische und Kämmen von RNase befreit, indem sie 30 min in 50 mM NaOH eingelegt wurden. 20 µg RNA wurden in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß mit nucleasefreiem H₂O auf 25 µL aufgefüllt, mit 5 µL Probenpuffer versetzt und 10 min bei 65 °C denaturiert. Außerdem wurde 1 g Agarose in 90 mL 1x MOPS aufgekocht und, nachdem sie auf 40 °C abgekühlt war, mit 10 mL Formaldehyd (37 % v/v) versetzt. Das Gel wurde luftblasenfrei in eine Flachbettkammer mit einem senkrecht eingesteckten Kamm gegossen. Nachdem das erstarrte Gel in die Laufkammer gelegt und mit einer Pufferschicht 1x MOPS bedeckt worden war, wurde der Kamm entfernt und die Geltaschen mit den RNA-Proben beladen. Die Auftrennung der RNA erfolgt bei 12 mA für 3-4 h, bis der Farbstoff des Standards die anodische Gelkante erreicht hatte. Der 1x MOPS-Puffer wurde dabei mit einer Pumpe entgegen der Laufrichtung gepumpt und gekühlt. Im Anschluss wurde das Gel zur Kontrolle der Beladung mit RNA auf dem UV-Tisch fotografiert (18 und 28 S rRNA).

3.11.4 Der Transfer der getrennten RNA auf Nylon-Membranen durch Northern-Blot

Der Transfer der nach der Größe aufgetrennten RNA von dem Agarosegel auf eine positiv geladene Nylonmembran erfolgte mit Hilfe der Kapillar-Saug-Wirkung von Filterpapier (Southern 1975) (Abb. 7). Die Transferschale, in der der Transfertisch stand, wurde zu drei Vierteln mit 20x SSC befüllt. Grobes Filterpapier (Whatman Papier, 12 cm x 24 cm) wurde in 5x SSC getränkt und so über den Transfertisch gelegt, dass es links und rechts in die 20x SSC-Lösung eintauchte. Zunächst wurden ein feines und ein grobes, in 5x SSC getränktes Filterpapier (Whatman Papier, 11 cm x 14 cm) nacheinander blasenfrei auf das Agarosegel

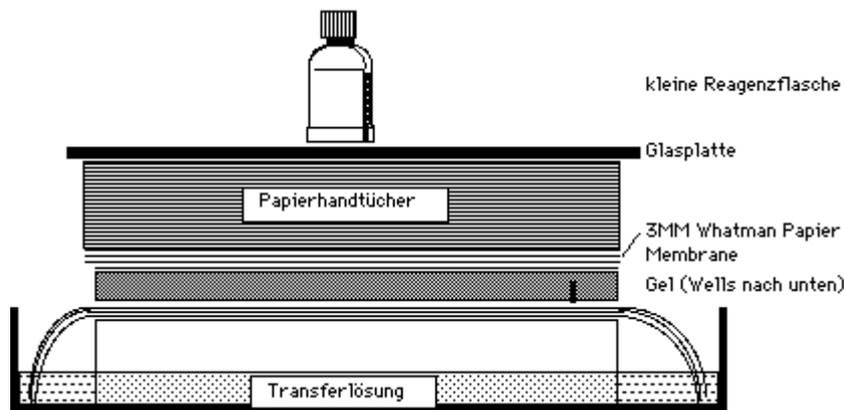


Abb. 7: Ein Beispiel für den Aufbau eines Northern-Blot-Transfers.

aufgelegt. Das Gel wurde mit den Geltaschen nach unten auf dem Transfertisch platziert. Dann wurden die in nucleasefreiem H_2O und 5x SSC aktivierte Membran (Hybond-N-Membran, 11 cm x 14 cm), gefolgt von einem weiteren feinen und groben, in 5x SSC getränkten Filterpapier blasenfrei auf dem Gel platziert. Die Seiten wurden mit Parafilm abgedichtet, großzügig Zellstoff aufgelegt, und dieser mit einer Plexiglasplatte beschwert. Der Aufbau wurde austariert und bei Bedarf 20x SSC nachgegossen. Nach 16 bis 20 Stunden war der Transfer abgeschlossen. Die Apparatur wurde abgebaut, und die Membran zur Kontrolle des Transfers ebenfalls auf dem UV-Tisch fotografiert. Die Fixierung der RNA auf beiden Seiten der Nylonmembran erfolgte mit Hilfe des UV-Crosslinker (Biometra, jeweils 0,12 J, 45 s). Im Anschluss wurde die Membran zwei bis dreimal in 20 mL kochenden, nucleasefreien H_2O , dem 200 μ L 10%ige SDS-Lösung zugesetzt wurden, entfärbt. Nach einem weiteren Waschgang in Mal in reinem H_2O wurde die Membran getrocknet und bis zur Hybridisierung in Aluminiumfolie eingeschlagen aufbewahrt.

3.11.5 Der Nachweis der getrennten RNA auf Nylon-Membranen

Zunächst wurde die Membran, zur Blockierung von unspezifischen Bindungen, 2 - 3 h in einem Hybridisierungsglas in 10 mL Prähybridisierungslösung im Ofen bei 38 °C prähybridisiert. 50pM CYP2B1 (5'-GGTTGGTAGCCGGTGTGA-3'), ACO1 (5'-AGGCTGTGAGGATCAGAGTTC-3') oder GAPDH (5'-CAGGATGCATTGCTGACAATCT TGA-3') wurden in 3 μ L nucleasefreiem H_2O in einem Reaktionsgefäß 10 min bei 55 °C denaturiert, anzentrifugiert und auf Eis gestellt. Alle weiteren Arbeiten wurden hinter einer Plexiglasscheibe im Isotopenbereich durchgeführt. 1 μ L 10x Puffer (Boehringer) 5 μ L (γ - ^{32}P) ATP und 1 μ L T4-Kinase wurden zu der radioaktiv zu markierenden Sonde gegeben und im Heizblock 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion mit 40 μ L EDTA (100 mM) abgestoppt. Die Sephadex-Kartusche wurde nach Anweisung des Herstellers vorbereitet. Die Lösung mit der markierten Sonde wurde dann mittig auf die vorbereitete in ein neues Reaktionsgefäß überführte Sephadex-Kartusche pipettiert und zentrifugiert (Biofuge pico,

2 min bei 2.800 rpm ohne Bremse). Das Eluat enthielt die markierte Sonde. 400 µL Heringsperma-DNA und das komplette Eluat wurden nun zur Prähybridisierungslösung gegeben und das Hybridisierungsröhrchen mit der Membran über Nacht im Ofen bei 38 °C rotiert. Die Membran wurde aus dem Hybridisierungsröhrchen in eine Schale dreimal mit 2x, und jeweils 2mal mit 1x und 0,1x SSC/ SDS-Waschlösung (37 °C) für 5 min gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die Radioaktivität gemessen. Der Vorgang wurde nach dem Waschschrift abgebrochen, bei dem die Radioaktivität ungefähr ein Zehntel des Ausgangswertes betrug. Am Ende wurde die Membran luftblasenfrei in Frischhaltefolie eingeschweißt und die gebundene Radioaktivität im Phospho-Imager (Fujix BAS 1500 Bio-Imaging Analyzer, Fujix, Tokio, Japan) detektiert und quantifiziert.

3.11.6 Die Rehybridisierung von Nylon-Membranen

Die Membran wurde etwa dreimal 5 min mit kochendem, nucleasefreiem H₂O gewaschen bis die Radioaktivität entfernt war, erneut in Prähybridisierungslösung eingelegt und wie unter 3.11.5 weiterbehandelt.

3.12 Die Herstellung von CAR-Promotorfragmenten der Ratte

Bei der Klonierung der Plasmide pGL3rCARprom4,4, pGL3rCARprom2,6 und pGL3rCARprom1,9 und pGL3rCARprom2,2_DING wurde ausgehend vom 5'-untranslatierten Bereich des CAR-Gens der Ratte mit geeigneten Oligonukleotiden ein unterschiedlich langes Stück des Promotors „*upstream*“ des CAR-Gens amplifiziert und in die *NheI*- und *XhoI*-Schnittstelle des Vektors pGL3-Basic (Promega) ligiert, so dass das Luciferase-Gen des Vektors unter der Kontrolle des CAR-Promotors stand. Die Plasmide pGL3rCARprom1,2 und pGL3rCARprom1,0 wurden ausgehend vom Plasmid pGL3rCARprom1,9 durch Verdau mit den Enzymen *BstXI* bzw. *PstI* und *SacI*, anschließendes Auffüllen der Überhänge mit Klenow und Religation des verbleibenden Vektors hergestellt. Die Plasmide pGL3rCARprom1,9_ΔDR1d, pGL3rCARprom1,9_ΔDR1c und pGL3rCARprom1,9_ΔDR1p wurden ebenfalls ausgehend vom Plasmid pGL3rCARprom1,9 hergestellt. Diesmal jedoch durch Mutations-PCR mit spezifischen Primern die jeweils eines der drei DR1-Motive ausschlossen. Diese Fragmente wurden erneut in den pGL3basic Reporter-genvektor religiert. Mit all diesen Reporter-genkonstrukten konnte der Einfluss von PPARα-Agonisten und Adrenalin auf die transkriptionelle Aktivität des CAR-Promotors der Ratte untersucht werden.

3.12.1 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei RT gelagert.

SDS-Stammlösung 10 % (w/v) siehe 3.7.1

Tris/HCl-Stammlösung (1 M) siehe 3.7.1

Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 7,5 oder pH 8,5 eingestellt.

Lysispuffer für DNA-Isolierung

Tris-HCl (pH 8,5)	100 mM	1 mL	1 M Stlsg.
EDTA (pH 8,0)	5 mM	100 µL	0,5 M Stlsg.
SDS	0,2 %	200 µL	10 % Stlsg.
NaCl	200 mM	117 mg	
H ₂ O		ad 10 mL	

TE-Puffer

Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM	100 µL	1 M Stlsg.
EDTA (pH 8,0)	1 mM	20 µL	0,5 M Stlsg.
H ₂ O		ad 10 mL	

6x Loading Dye Solution (MBI-Fermentas)

Bromphenolblau	0,03% (w/v)
Xylene-Cyanol FF	0,03% (w/v)
Glycerol	60 % (v/v)
Tris-HCl (pH 7,6)	10 mM
EDTA	60 mM

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

10x Puffer Tango™ (MBI-Fermentas)

Tris-Acetat (pH 7,9)	33 mM
Mg-Acetat	10 mM
K-Acetat	66 mM
BSA	0.1 mg/ mL

Die Enzyme BstXI, PstI und SacI (jeweils 10 U/ µL) wurden auch bei MBI-Fermentas bezogen und bei -20 °C gelagert.

Zu der verwendeten BIO-X-ACT Long DNA-Polymerase (Bioline, Luckenwalde) wurde eine 50 mM MgCl₂-Lösung, sowie ein 10x Reaktionspuffer ‚OptiBuffer‘ und ein 5x Hi-spec Additive, über deren Zusammensetzung keine weiteren Angaben gemacht wurden, mitgeliefert.

Die Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

10x Reaktionspuffer (Klenow) (MBI-Fermentas)

Tris-HCl (pH 8,0)	500 mM
MgCl ₂	50 mM
DTT	10 mM

PBS (1x) siehe 3.2.1

2 mM dNTPs siehe 3.10.1

Klenow Fragment (10 U/ μ L)

Das Klenow-Fragment ist die große Untereinheit der DNA Polymerase I, *E.coli*. es besitzt zwar eine 5'=>3' Polymerase Aktivität und eine 3'=>5' Exonuclease (Korrekturlesen) Aktivität, jedoch keine 5'=>3' Exonuclease Aktivität. Es wurde mit dem Puffer bei MBI-Fermentas bezogen und bei -20 °C gelagert.

3.12.2 Die Isolierung genomischer DNA aus Hepatozyten der Ratte

Je 1×10^6 Hepatozyten (Isolation 3.1) wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 1000 rpm (Tischzentrifuge Biofuge pico; 5 min, 95 x g) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 mL 1x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Zum Pellet wurden 250 μ L Lysispuffer für DNA-Isolierung und 2,5 μ L Proteinase K (10 mg/ mL) pipettiert und die Lösung bei 55 °C etwa 90 min im Thermoschüttler inkubiert, bis sich das Pellet gelöst hatte. Die Probe wurde 10 min bei 13.000 rpm (Tischzentrifuge, 16.060 x g) zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und soviel Isopropanol dazugegeben, bis eine Trübung eintrat. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß 5 min bei 13.000 rpm (16.060 x g) zentrifugiert. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C. Zunächst wurden 500 μ L Ethanol (70 % (v/v), -20 °C) auf jedes Pellet gegeben und bei 4 °C für 10 min zentrifugiert (SIGMA 1215/4-H Rotor, SIGMA 3K30 Zentrifuge; 20.627 x g). Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet etwa 10 min bei RT getrocknet. Nach Zugabe von 125 μ L TE-Puffer wurde die DNA im Thermoschüttler bei 55 °C 1-2 h gelöst und im Anschluss bei 13.000 rpm (Biofuge pico, 1 min, 16.060 x g) zentrifugiert. Die DNA befand sich im Überstand. Ein Teil der DNA-haltigen Probe wurde anschließend 1:200 mit H₂O verdünnt und die Extinktion bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Proteine) gemessen, um so Konzentration und Reinheit der DNA-Lösung zu bestimmen. Es wurde nur DNA verwendet, deren Quotient 260 nm / 280 nm > 1,7 war. Die DNA-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{DNA-Konzentration (ng/}\mu\text{L)} = \Delta E_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnung} \times 50 \text{ ng/}\mu\text{L}.$$

Die Hepatozyten-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.12.3 PCR mit genomischer DNA aus Hepatozyten der Ratte als Matrize

Das PCR-Protokoll: 3 min 95 °C; 35 x (1 min 95 °C, 1 min 55 °C, 4 min 72 °C); 10 min 72 °C

Matrize: genomische DNA aus Hepatozyten der Ratte

	<u>„sense“-</u>	<u>„antisense“-</u>	<u>PCR-Produkt</u>
<u>Promotorfragment</u>	<u>Oligonukleotide</u>	<u>Oligonukleotide</u>	
rCARprom4,4	rCARprom_F16	rCARprom_R5	4,4 kb
rCARprom2,6	rCARprom_F14	rCARprom_R5	2,6 kb
rCARprom1,9	rCARprom_F13	rCARprom_R5	1,9 kb
rCARprom2,2_DING	rCARprom_F13	rCARprom_DING_R	2,2 kb

Zur Amplifikation der Fragmente vor dem Translationsstart des CAR-Gens wurden 2 µg genomische DNA aus Hepatozyten der Ratte als Matrize in eine PCR mit den jeweiligen Oligonukleotiden (Tabelle) eingesetzt. Die verwendete BIO-X-ACT Long DNA-Polymerase zeichnet sich durch hohe Prozessivität und Genauigkeit aus. Die mitgelieferte 5x Hi-spec Additive-Lösung soll zusätzlich als spezifischer Verstärker der Amplifikation genomischer DNA-Abschnitte wirken. Die PCR-Bedingungen wurden prinzipiell wie vom Hersteller empfohlen gewählt. In einem Vorversuch wurden zunächst verschiedene MgCl₂-Konzentrationen und „*Annealing*“-Temperaturen getestet. Die PCRs wurden dann unter folgende als optimal getesteten Bedingungen ausgeführt.

Der PCR-Mix für eine Probe:

OptiBuffer (Bioline)	1x	5 µL	10x
dNTPs	0,2 mM	5 µL	2 mM
MgCl ₂	2,5 mM	2,5 µL	50 µM
High-Spec-Additive	1x	10 µL	5x
genomische DNA (Ratte)	2 µg	5 µL	0,4 µg/ µL
Sense-Oligonukleotid	0,6 µM	1,5 µL	20 µM
Antisense-Oligonukleotid	0,6 µM	1,5 µL	20 µM
BIO-X-ACT Long DNA-Polymerase	8 U	2 µL	4 U/µL
H ₂ O		ad 50 µL	

Nach Abschluss der PCR wurden die Proben mit 10µL 6x Loading Dye Solution (MBI-Fermentas) versetzt und komplett auf ein 1 % (w/v) Agarosegel aufgetragen. Blunt-end in pJET ligiert (3.16.2), die Orientierung geprüft (3.16.3), herausgeschnitten (*XhoI* und *XbaI*) und in pGL3 (*NheI* und *XhoI*) in der richtigen Orientierung einligiert (3.17).

3.12.4 PCR mit pGL3rCARprom1,9 als Matrize

Das PCR-Protokoll: 3 min 95 °C; 35 x (1 min 95 °C, 1 min 60 °C, 2 min 72 °C); 10 min 72 °C

Matrize: pGL3rCARprom1,9

<u>Promotorfragment</u>	<u>„sense“- Oligonukleotide</u>	<u>„antisense“- Oligonukleotide</u>	<u>PCR- Produkt</u>
rCARprom1,9_ΔDR1d_1	rCARprom_ΔDR1d_F	GL2	1,6 kb
rCARprom1,9_ΔDR1d_2	RV3	rCARprom_ΔDR1d_R	0,3 kb
rCARprom1,9_ΔDR1c_1	rCARprom_ΔDR1c_F	GL2	1,0 kb
rCARprom1,9_ΔDR1c_2	RV3	rCARprom_ΔDR1c_R	0,9 kb
rCARprom1,9_ΔDR1p_1	rCARprom_ΔDR1p_F	GL2	0,5 kb
rCARprom1,9_ΔDR1p_2	RV3	rCARprom_ΔDR1p_R	1,4 kb

d = distal; c = zentral; p = proximal

Zur Amplifikation der Fragmente vor und hinter dem zu deletierenden DR1-Motiv wurde 1 ng pGL3rCARprom1,9 als Matrize in eine PCR mit den jeweiligen Oligonukleotidpaaren eingesetzt. Eines der Oligonukleotide einer PCR band jeweils an den CAR-Promotor vor oder hinter einem der drei DR1-Motiv und enthielt zusätzlich am 5'-Ende eine *PvuI*-Erkennungssequenz, das andere Oligonukleotid band in der „*Multi-cloning-site*“ des pGL3basic-Vectors. Folgende Restriktionsstellen wurden dort genutzt: GL2 (*BglII*) RV3 (*MluI*).

Die PCRs wurden dann unter diesen als optimal getesteten Bedingungen ausgeführt.

Der PCR-Mix für eine Probe:

OptiBuffer (Bioline)	1x	5 µL	10x
dNTPs	0,2 mM	5 µL	2 mM
MgCl ₂	2,5 mM	2,5 µL	50 µM
High-Spec-Additive	1x	10 µL	5x
pGL3rCARprom1,9	1 ng	5 µL	0,2 µg/ µL
Sense-Oligonukleotid	0,6 µM	1,5 µL	20 µM
Antisense-Oligonukleotid	0,6 µM	1,5 µL	20 µM
BIO-X-ACT Long DNA-Polymerase	8 U	2 µL	4 U/µL
H ₂ O		ad 50 µL	

Nach Abschluss der PCR wurden die Proben mit 10 µL 6x Loading Dye Solution (MBI-Fermentas) versetzt und komplett auf ein 1 % (w/v) Agarosegel aufgetragen. Blunt-end in pJET ligiert, herausgeschnitten (*PvuI* und *MluI* (RV3) bzw. *BglII* (GL2)) und in pGL3 (*MluI*, *BglII*) in der richtigen Orientierung einligiert.

3.12.5 Der Verdau von pGL3rCARprom1,9 zur Gewinnung verkürzter CAR-Promotorfragmente

Zur Herstellung Promotorgenkonstrukte pGL3rCARprom1,2 und pGL3rCARprom1,0 wurden 5 µg pGL3rCARprom1,9 mit Enzymen verdaut, die jeweils nur eine spezifische Schnittstelle vor (*Bst*XI) bzw. hinter (*Pst*I) dem zentralen DR1-Motiv des CAR-Promotors hatten und einem Enzym welches im Vektor oberhalb der Einklonierungsstelle spaltete (*Sac*I).

Die Restriktionsenzyme für die Herstellung verkürzter CAR-Promotorfragmente

Resultierendes Plasmid	Restriktionsenzym 1	Restriktionsenzym 2	Fragmentlänge
pGL3rCARprom1,2	<i>Bst</i> XI	<i>Sac</i> I	6,0 kb
pGL3rCARprom1,0	<i>Pst</i> I	<i>Sac</i> I	5,8 kb

Die Verdau wurden dann unter folgende Bedingungen ausgeführt.

Der Verdau für die Herstellung von pGL3rCARprom1,0

1x Tango™	1x	2,5 µL	10x
<i>Pst</i> I	20 U	2 µL	10 U/ µL
<i>Sac</i> I	20 U	2 µL	10 U/ µL
pGL3rCARprom1,9	5 µg	2 µL	2,5 µg/ µL
H ₂ O		ad 25 µL	

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Der Verdau für die Herstellung von pGL3rCARprom1,2

1x Tango™	1x	2,5 µL	10x
<i>Bst</i> XI	20 U	2 µL	10 U/ µL
<i>Sac</i> I	20 U	2 µL	10 U/ µL
pGL3rCARprom1,9	5 µg	2 µL	2,5 µg/ µL
H ₂ O		ad 25 µL	

Der Ansatz wurde zunächst 2h bei 55 °C (*Bst*XI aktiv) und anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Verdau für 20 min bei 80 °C zur Inaktivierung der Enzyme erhitzt. Dann wurde die Verdau abgekühlt und wie folgt weiterbehandelt, um die nach dem Verdau entstandenen 3'-Enden wieder aufzufüllen.

Verdau		25 µL	
Reaktionpuffer (Klenow)	1x	4 µL	10x
Klenow-Fragment	10 U	1 µL	10 U/ µL
dNTP	1 ng	1 µL	2 mM
H ₂ O		ad 40 µL	

Nach 10 min Inkubation bei 37 °C wurden die Reaktionen für 10 min bei 75 °C abgestoppt. Dann wurden die Proben mit 8 µL 6x Loading Dye Solution (MBI-Fermentas) versetzt und komplett auf ein 1 % (w/v) Agarosegel aufgetragen, ausgeschnitten, gereinigt und religiert.

3.13 Die Herstellung von CYP2B1-Promotorfragmenten der Ratte

Das Wildtyp-Reportergenplasmid pGL3C2B1 (2650 bp des CYP2B1-Promotors) und die davon ausgehenden internen Deletionsplasmide pGL3CD2 (-353 bis -176 bp), pGL3CD3 (-701 bis -356 bp), pGL3CD4 (-1063 bis -700 bp), pGL3CD5 (-1451 bis -1075 bp), pGL3CD6 (-1807 bis -1453 bp), pGL3CD7 (-2156 bis -1808 bp) und pGL3CD8 (-2626 bis -2156 bp, kein PBREM) wurden freundlicherweise von Daniel Bauer (Bauer et al. 2001) zur Verfügung gestellt. Da das Plasmid pGL3CD2 nicht mehr auf PPAR α -Agonisten reagierte, wurden neue Konstrukte, die den, im Konstrukt CD2 deletierten, Bereich weiter eingrenzten, hergestellt. Die Plasmide pGL3CD2A (-260 bis -176 bp), pGL3CD2B (-235 bis -176 bp), pGL3CD2C (-353 bis -244 bp) und pGL3CD2D (-353 bis -280 bp) wurden durch Mutations-PCR aus pGL3C2B1 synthetisiert. Ein Oligonukleotid eines Paares wurden am 5'-Ende von einer *EcoRI*-Schnittstelle flankiert, das andere enthielt eine interne *PstI* oder *BglII*-Schnittstelle. Über diese beiden Schnittstellen wurde das Fragment später in pGL3CD2 einkloniert. pGL3CD2E (-260 to -244 bp) entstand aus dem Verdau von pGL3CD2A mit *PstI* und *EcoRI* und Reklonierung des erhaltenen Fragments in pGL3CD2C. pGL3C2B1_PPRES_mut und pGL3C2B1_ER4_mut, wurden durch Mutationsprimer mit Punktmutationen hergestellt.

3.13.1 Puffer und Lösungen

Die nicht hier aufgeführten Lösungen wurden bereits unter 3.12.1 beschrieben.

10x Puffer O (MBI-Fermentas)

Tris-HCl (pH 7,5)	50 mM
MgCl ₂	10 mM
NaCl	100 mM
BSA	0.1 mg/ mL

Die Enzyme *BglII*, *PstI* und *EcoRI* (jeweils 10 U/ µL) wurden auch bei MBI-Fermentas bezogen und bei -20 °C gelagert.

Zu der verwendeten Powerscript-DNA-Polymerase (PAN, Nürnberg) wurde eine 50 mM MgCl₂-Lösung, sowie ein 10x Reaktionspuffer ‚OptiBuffer‘ und ein 5x Hi-spec Additive, über deren Zusammensetzung keine weiteren Angaben gemacht wurden, mitgeliefert und bei -20 °C gelagert.

3.13.2 PCR mit pGL3C2B1 als Matrize

Das PCR-Protokoll: 3 min 95 °C; 35 x (1 min 95 °C, 1 min 50 °C, 2 min 72 °C); 10 min 72 °C

Matrize: pGL3C2B1

<u>Promotorfragment</u>	<u>.sense'- Oligonukleotide</u>	<u>.antisense'- Oligonukleotide</u>	<u>PCR- Produkt</u>
CD2A	C2B1_F1A (<i>Pst</i> I)	C2B1_R1B (<i>Eco</i> RI)	312 bp
CD2B	C2B1_F1A (<i>Pst</i> I)	C2B1_R1C (<i>Eco</i> RI)	343 bp
CD2C	C2B1_F2B (<i>Eco</i> RI)	C2B1_R2C (<i>Bgl</i> II)	311 bp
CD2D	C2B1_F2A (<i>Eco</i> RI)	C2B1_R2C (<i>Bgl</i> II)	347 bp

Zur Amplifikation der Fragmente vor und hinter dem zu deletierenden DR1-Motiv wurde 1 ng pGL3C2B1 als Matrize in eine PCR mit den jeweiligen Oligonukleotidpaaren eingesetzt. Eines der Oligonukleotide einer PCR band jeweils an den CYP2B1-Promotor vor oder hinter dem im pGL3CD2 (-353 bis -176 bp) deletierten Bereich des Promotors und das andere band im Bereich von -353 bis -176 bp und enthielt zusätzlich am 5'-Ende eine *Eco*RI-Erkennungssequenz, Die PCRs wurden dann unter folgende als optimal getesteten Bedingungen ausgeführt.

Der PCR-Mix für eine Probe:

OptiBuffer (Bioline)	1x	5 µL	10x
dNTPs	0,2 mM	5 µL	2 mM
MgCl ₂	3 mM	3 µL	50 µM
High-Spec-Additive	1x	10 µL	5x
pGL3C2B1	1 ng	5 µL	0,2 µg/ µL
Sense-Oligonukleotid	0,6 µM	1,5 µL	20 µM
Antisense-Oligonukleotid	0,6 µM	1,5 µL	20 µM
BIO-X-ACT Long DNA-Polymerase	8 U	2 µL	4 U/µL
H ₂ O		ad 50 µL	

Nach Abschluss der PCR wurden die Proben mit 10µL 6x Loading Dye Solution (MBI-Fermentas) versetzt und komplett auf ein 1 % (w/v) Agarosegel aufgetragen. Wie ausführlich unter 3.15 beschrieben, wurden die Proben mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, dann die Banden der gewünschten Größe ausgeschnitten und aufgereinigt. Im Anschluß erfolgte ein Verdau der Proben mit den jeweiligen Restriktionsenzymen.

3.13.3 Mutations-PCR mit pGL3C2B1 als Matrize

Im proximalen CYP2B1-Promotor befanden sich theoretisch sowohl ein PPRE- (PPAR α -Bindeelement) als auch ein ER4-Motiv. Mit Hilfe von Mutationsprimern wurden

Punktmutationen in diese potentiellen Bindemotive eingefügt, die die Erkennungssequenz für Transkriptionsfaktoren zerstörten.

Das PCR-Protokoll: 3 min 95 °C; 35 x (1 min 95 °C, 1 min 60 °C, 2 min 72 °C); 10 min 72 °C

Matrize: pGL3C2B1

<u>Promotorfragment</u>	<u>.sense'- Oligonukleotide</u>	<u>.antisense'- Oligonukleotide</u>	<u>PCR- Produkt</u>
PPARmut_A	C2B1_F1A (<i>Pst</i> I)	CYP_PPARmut-R	287 bp
PPARmut_B	CYP_PPARmut-F	C2B1_R2C (<i>Bgl</i> II)	356 bp
ER4mut_A	C2B1_F1A (<i>Pst</i> I)	CYP_ER4mut-R	366 bp
ER4mut_B	CYP_ER4mut-F	C2B1_R2C (<i>Bgl</i> II)	272 bp

Jeweils 10 ng pGL3C2B1 wurde als Matrize in eine PCR mit den jeweiligen Oligonukleotidpaaren eingesetzt. Eines der Oligonukleotide einer PCR band jeweils an den CYP2B1-Promotor vor oder hinter dem im pGL3CD2 (-353 bis -176 bp) deletierten Bereich des Promotors und enthielt eine natürliche Schnittstelle. Das andere Oligonukleotid hybridisierte im Bereich des Bindemotivs und enthielt Punktmutationen, die durch die Amplifikationsschritte in das PCR-Produkt eingeführt wurden. Die PCRs wurden dann unter folgenden als optimal getesteten Bedingungen ausgeführt.

Der PCR-Mix für eine Probe:

10x OptiBuffer (PAN)	1x	5 µL	10x
dNTPs	0,2 mM	5 µL	2 mM
MgCl ₂	1,5 mM	1,5 µL	50 µM
High-Spec-Additive	1x	10 µL	5x
pGL3C2B1	10 ng	2 µL	5 ng/ µL
Sense-Oligonukleotid	0,6 µM	1,5 µL	20 µM
Antisense-Oligonukleotid	0,6 µM	1,5 µL	20 µM
Powerscript-DNA-Polymerase	2 U	0,5 µL	4 U/µL
H ₂ O		ad 50 µL	

Nach Abschluss der PCR wurden die Proben mit 10µL 6x Loading Dye Solution (MBI-Fermentas) versetzt und komplett auf ein 2% (w/v) Agarosegel aufgetragen. Wie ausführlich unter 3.15 beschrieben, wurden die Proben mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, dann die Banden der gewünschten Größe ausgeschnitten, aufgereinigt, quantifiziert und in eine weitere PCR als Matrize eingesetzt.

Das PCR-Protokoll: 3 min 95 °C; 35 x (1 min 95 °C, 1 min 55 °C, 1 min 72 °C); 10 min 72 °C

Matrize: PCR-Produkte A und B

<u>Promotorfragment</u>	<u>.sense'- Oligonukleotide</u>	<u>.antisense'- Oligonukleotide</u>	<u>PCR- Produkt</u>
PPARmut	C2B1_F1A (<i>Pst</i> I)	C2B1_R2C (<i>Bgl</i> II)	625 bp
ER4mut	C2B1_F1A (<i>Pst</i> I)	C2B1_R2C (<i>Bgl</i> II)	625 bp

Der PCR-Mix für eine Probe:

10x OptiBuffer (PAN)	1x	5 µL	10x
dNTPs	0,2 mM	5 µL	2 mM
MgCl ₂	1,5 mM	1,5 µL	50 µM
High-Spec-Additive	1x	10 µL	5x
PPARmut_A oder ER4mut_A	10 ng	2 µL	20ng/ µL
PPARmut_B oder ER4mut_B	10 ng	2 µL	20ng/ µL
C2B1_F1A (<i>Pst</i> I)	0,6 µM	1,5 µL	20 µM
C2B1_R2C (<i>Bgl</i> II)	0,6 µM	1,5 µL	20 µM
Powerscript-DNA-Polymerase	2 U	0,5 µL	4 U/µL
H ₂ O		ad 50 µL	

Nach Abschluss der PCR wurden die Proben mit 10µL 6x Loading Dye Solution (MBI-Fermentas) versetzt und komplett auf ein 2% (w/v) Agarosegel aufgetragen. Wie ausführlich unter 3.15 beschrieben, wurden die Proben mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, dann die Banden der gewünschten Größe ausgeschnitten und aufgereinigt. Im Anschluss erfolgte ein Verdau der Proben mit den jeweiligen Restriktionsenzymen.

3.13.4 Der Verdau von pGL3C2B1 und der CYP2B1-Promotorfragmente PPARmut und ER4mut zur Gewinnung neuer CYP2B1-Promotormutationskonstrukte

Die Restriktionsenzyme zur Herstellung von pGL3C2B1 PPARmut und pGL3C2B1 ER4mut

Resultierendes Plasmid	Restriktionsenzym 1	Restriktionsenzym 2	Fragmentlänge
PPAR_mut	<i>Pst</i> I	<i>Bgl</i> II	~625 bp
ER4_mut	<i>Pst</i> I	<i>Bgl</i> II	~625 bp
pGL3C2B1	<i>Pst</i> I	<i>Bgl</i> II	~6800 bp

Der Verdau für die Herstellung von pGL3C2B1 PPARmut und pGL3C2B1 ER4mut

1x Puffer O	1x	2,5 µL	10x
<i>Pst</i> I	10 U	1 µL	10 U/ µL
<i>Bgl</i> II	10 U	1 µL	10 U/ µL
PCR-Produkt PPAR_mut, ER4_mut oder pGL3C2B1		10 µL bzw. 5 µg	
H ₂ O		ad 25 µL	

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Abschluss wurden die verdauten

Proben mit 5 µL 6x Loading Dye Solution (MBI-Fermentas) versetzt und komplett auf ein 1 % (w/v) Agarosegel aufgetragen.

3.13.5 Der Verdau von pGL3CD2 und der CYP2B1-Promotorfragmente CD2A-D zur Gewinnung neuer CYP2B1-Promotordeletionskonstrukte

Die Restriktionsenzyme für die Herstellung der CD2A bis D-Promotorfragmente

Resultierendes Plasmid	Restriktionsenzym 1	Restriktionsenzym 2	Fragmentlänge
pGL3CD2A	<i>Pst</i> I	<i>Eco</i> RI	~300 bp
pGL3CD2B	<i>Pst</i> I	<i>Eco</i> RI	~330 bp
pGL3CD2C	<i>Eco</i> RI	<i>Bgl</i> II	~300 bp
pGL3CD2D	<i>Eco</i> RI	<i>Bgl</i> II	~330 bp
pGL3CD2	<i>Pst</i> I	<i>Eco</i> RI	~7000 bp
pGL3CD2	<i>Eco</i> RI	<i>Bgl</i> II	~7000 bp

Die Verdau wurden dann unter folgende Bedingungen ausgeführt.

Der Verdau für die Herstellung von pGL3CD2A und pGL3CD2B

1x Puffer O	1x	2,5 µL	10x
<i>Pst</i> I	10 U	1 µL	10 U/ µL
<i>Eco</i> RI	10 U	1 µL	10 U/ µL
PCR-Produkt CD2A, CD2B oder pGL3CD2		10 µL bzw. 5 µg	
H ₂ O		ad 25 µL	

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Der Verdau für die Herstellung von pGL3CD2C und pGL3CD2D

1x Puffer O	1x	2,5 µL	10x
<i>Eco</i> RI	10 U	1 µL	10 U/ µL
<i>Bgl</i> II	10 U	1 µL	10 U/ µL
PCR-Produkt CD2C, CD2D oder pGL3CD2		10 µL bzw. 5 µg	
H ₂ O		ad 25 µL	

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Abschluss wurden die verdauten Proben mit 5 µL 6x Loading Dye Solution (MBI-Fermentas) versetzt und komplett auf ein 1 % (w/v) Agarosegel aufgetragen.

3.13.6 Der Verdau von pGL3CD2A und pGL3CD2C zur Gewinnung des neuen CYP2B1-Promotordeletionskonstrukts pGL3CD2E

Aus den pGL3CDA und pGL3CD2C (3.15 bis 3.21) wurde mittels Verdau das Reporterplasmid pGL3CD2E konstruiert.

Die Restriktionsenzyme für die Herstellung der pGL3CD2E

Eingesetztes Plasmid	Restriktionsenzym 1	Restriktionsenzym 2	Fragmentlänge
pGL3CD2A	<i>Pst</i> I	<i>Eco</i> RI	~300 bp
pGL3CD2C	<i>Pst</i> I	<i>Eco</i> RI	~7100 bp

Der Verdau für die Herstellung von pGL3CD2E

1x Puffer O	1x	2,5 µL	10x
<i>Pst</i> I	10 U	1 µL	10 U/ µL
<i>Eco</i> RI	10 U	1 µL	10 U/ µL
pGL3CD2A und pGL3CD2C	5 µg	2 µL	2,5 µg/ µL
H ₂ O		ad 25 µL	

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Nach Abschluss wurden die verdauten Proben mit 5 µL 6x Loading Dye Solution (MBI-Fermentas) versetzt und komplett auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen.

3.14 Die Herstellung von DNA-Fragmenten für die PCR-Standards

Für die quantitative Analyse der CAR- bzw. β-Actin-mRNA Menge zu Beginn der quantitativen Real-Time-PCR wurden Standards benötigt. Dazu wurde die PCR-Produkte mittels konventioneller RT-PCR aus mRNA von Hepatozyten amplifiziert, isoliert, die Enden aufgefüllt und in pJET „blunt-end“ inkloniert.

3.14.1 Puffer und Lösungen

Die nicht hier aufgeführten Lösungen wurden bereits unter 3.12.1 beschrieben.

10x Puffer BIOTAQ Red™

(NH ₄) ₂ SO ₄	160 mM
Tris-HCl	670 mM
Tween-20	0,1 %

Der Puffer hatte einen pH-Wert von pH 8,3 und war der BIOTAQ Red™ DNA Polymerase beigefügt. Er wurde bei -20 °C gelagert.

Magnesiumchlorid-Lösung (50 mM)

Die Lösung war in einer Konzentration von 50 mM der BIOTAQ Red™ DNA Polymerase beigefügt und wurde bei -20 °C gelagert.

3.14.2 PCR zur Herstellung der RTQ-PCR-Standards

Aus Hepatozyten wurde mRNA isoliert (3.9) und in cDNA (3.10) transkribiert. Die cDNA wurde mit H₂O 1:40 verdünnt (2 µL cDNA + 78 µL H₂O) und 5 µL dieser Verdünnung in die PCR eingesetzt.

Das PCR-Protokoll: 3 min 95 °C; 35 x (1 min 95 °C, 1 min 63 °C, 1 min 72 °C); 10 min 72 °C

Matrize: cDNA aus Hepatozyten der Ratte

<u>PCR-Produkt</u>	<u>.sense'- Oligonukleotide</u>	<u>.antisense'- Oligonukleotide</u>	<u>PCR-Produkt</u>
CAR	rCAR_1F	rCAR_2R	455 bp
β-Actin	LC-r-ss--ActinF	LC-r-ss-ActinR	212 bp

Der PCR-Mix für eine Probe:

Puffer (Bioline)	1x	5 µL	10x
dNTPs	0,2 mM	5 µL	2 mM
MgCl ₂	1,5 mM	1,5 µL	50 µM
cDNA (Ratte)		5 µL	1:40 Verdünnung
Sense-Oligonukleotid	6 µM	1,5 µL	20 µM
Antisense-Oligonukleotid	6 µM	1,5 µL	20 µM
BIOTAQ Red™ DNA-Polymerase	1 U	0,2 µL	5 U/µL
H ₂ O		ad 50 µL	

Nach Abschluss der PCR wurden die Proben mit 10µL 6x Loading Dye Solution (MBI-Fermentas) versetzt und komplett auf ein 2 % (w/v) Agarosegel aufgetragen.

3.15 Die Agarosegel-Elektrophorese**3.15.1 Puffer und Lösungen**10x TAE-Puffer

Tris	0,5 M	16,56 g
Natriumacetat	0,2 M	16,4 g
EDTA	0,02 M	7,44 g
H ₂ O		ad 1000 mL

Der pH-Wert der Lösung wurde mit Essigsäure auf pH 8,0 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

1x TAE-Puffer

TAE-Puffer (10x)	1 x	100 mL
H ₂ O		ad 1000 mL

Die Lösung wurde bei RT gelagert.

Ethidiumbromid-Lösung

Ethidiumbromid	10 mg/ mL	100 mg
TAE-Puffer (1x)		10 mL

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert. Für das Ethidiumbromid-Färbebad wurden 300 mL 1x TAE-Puffer mit 75 µL dieser Lösung versetzt.

3.15.2 Die Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Das Agarosegel stellt ein komplexes Netzwerk an polymeren Molekülen dar, das die Diffusion der DNA-Moleküle herabsetzt. DNA-Moleküle sind negativ geladen und wandern in einem elektrischen Feld durch das Gel. Dabei bestimmt die Größe der DNA-Moleküle ihre Wanderungsgeschwindigkeit; sie ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer relativen Molekülmasse. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde die Gel-Elektrophorese mit Standard-DNA-Fragmenten bekannter Größe durchgeführt. Die Agarose-Konzentration des Gels richtete sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente und betrug hier 1 % oder 2 % (w/v) Agarose. Die eingewogene Agarose (1,6 g bzw. 3,2 g) wurde in 160 mL 1x TAE-Puffer in einem Mikrowellengerät aufgekocht und entgast. Die Lösung wurde auf ca. 60 °C abgekühlt und in eine Flachbettkammer mit zwei senkrecht eingesteckten Kämmen gegossen. Nach Erstarren des Gels wurden die Kämmen entfernt. Das Gel wurde in eine Laufkammer gelegt und diese so weit mit Laufpuffer (1 x TAE) gefüllt, dass das Gel mit einer Pufferschicht bedeckt war. Die Geltaschen wurden nun mit 10 µL PCR-Ansatz beladen; zur Bestimmung der Fragmentlänge wurde eine Geltasche mit dem Längenstandard ‚MassRuler™‘ beladen. Die Auftrennung der DNA erfolgt bei 80 V für 1,5-2 h, bis der Farbstoff des Standards die anodische Gelkante erreicht hatte. Anschließend wurde das Gel aus der Kammer genommen und für 20-30 min in ein Ethidiumbromid-Bad gelegt. Ethidiumbromid ist eine aromatische Verbindung, die mit den Basen der DNA interkaliert und durch UV-Licht zu oranger Fluoreszenz angeregt wird. So konnten die DNA-Fragmente mit Hilfe des ‚GelDoc™‘-Systems der Firma BioRad sichtbar gemacht und dokumentiert werden. Neben der Abschätzung der Fragmentgröße konnte der DNA-Längenstandard ‚MassRuler™‘ auch zur semiquantitativen Bestimmung der DNA-Menge in den Proben genutzt werden. Bei einer

Auftragsmenge von 10 µL PCR-Produkt pro Geltasche entsprachen die einzelnen Banden des MassRuler™ einer Konzentration von 8 bis 100 ng DNA.

3.15.3 Die Reinigung von DNA aus Agarosegelen mit dem ‚MinElute Gel Extraction‘-Kit

Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die gewünschten DNA-Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Diese Gelstücke wurden in 3 Volumen des Puffers QG für etwa 10 min bei 55 °C im Thermoschüttler inkubiert, bis sich das Gel vollständig aufgelöst hatte. Danach wurde die Lösung mit 1 Volumen Isopropanol invertiert und auf eine MinElute-Säule gegeben, die im Kit enthalten war. Durch einminütiges Zentrifugieren bei 13.000 rpm (Biofuge pico, 16.060 x g) konnte nun die DNA an die Säulenoberfläche binden. Nach der Zugabe von 500 µL Puffer QG wurde erneut zentrifugiert. Es folgte ein Waschgang mit 750 µL Puffer PE und zwei weitere Zentrifugationsschritte, um die Flüssigkeit möglichst vollständig aus der Säule zu entfernen. Zur Eluierung der DNA wurde die MinElute-Säule in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt, mit 10 µL Reinst- H₂O für 1 min bei RT inkubiert und dann 1 min zentrifugiert. Die DNA befand sich nun im Überstand. Sie wurde bei -20 °C gelagert.

3.16 Die Klonierung der Promotorfragmente und der RTQ-PCR-Standards in den pJET-Vektor

Das gereinigte DNA-Fragmente aus 3.12.3, 3.12.4 und 3.14.2 wurden „*blunt-end*“ in pJET kloniert. Da alle DNA-Fragmente mit Hilfe einer Taq-Polymerase, die am 3'-Ende einen dA-Überhang produziert, synthetisiert wurden, mussten die Enden der PCR-Produkte zunächst mit einem DNA-Blunting-Enzym aufgefüllt werden. Danach wurden die PCR-Produkte „*blunt-end*“ in pJET kloniert.

3.16.1 Puffer und Lösungen

Die nicht hier aufgeführten Lösungen wurden bereits unter 3.12.1 und 3.13.1 beschrieben.

Für die Klonierung wurde das GeneJET™ PCR Cloning Kit verwendet. Es beinhaltete unter anderem pJET1/blunt Cloning Vektor (50 ng/ µL), 2x Reaktionspuffer, T4 DNA Ligase (5 U/ µL), DNA Blunting Enzym, nukleasefreies Wasser. Über die nähere Zusammensetzung der Puffer machte der Hersteller keine Angaben. Sie wurden bei -20 °C gelagert.

10x Puffer R (MBI-Fermentas)

Tris-HCl (pH 8,5)	10 mM
MgCl ₂	10 mM
KCl	100 mM
BSA	0.1 mg/ mL

Alle Restriktionsenzyme (jeweils 10 U/ μ L) wurden bei MBI-Fermentas bezogen und bei -20 °C gelagert.

3.16.2 Die Ligation des Promotorfragmentes bzw. der PCR-Standards in den pJET-VektorDas Protokoll für die Ligation eines DNA-Fragments in pJETBlunting-Reaktion

2x Reaktionspuffer	1x	10 μ L	2x
DNA-Fragment		2 μ L	
DNA Blunting Enzym		1 μ L	
H ₂ O		ad 18 μ L	

Der Mix wurde kurz gevortext und 3-5 s an zentrifugiert. Nun erfolgte die Inkubation der Reaktion bei 70 °C für 5 min und anschließendes Abkühlen auf Eis. Zugabe von:

Ligationsreaktion

pJET1/blunt Cloning Vector	50 ng	1 μ L	50 ng/ μ L
T4 DNA Ligase	5 U	2 μ L	5 U/ μ L

Der Mix wurde erneut kurz gevortext und 3-5 s an zentrifugiert. Nun erfolgte die Inkubation der Reaktion bei 22 °C für 60 min. Im Anschluss wurde 10 min auf 65 °C erhitzt. Alle Plasmide wurden in kompetente *E.coli* XL-1 (blue) Bakterien transformiert (3.18), vermehrt und isoliert (3.19). Die PCR-Standards für rCAR und β -Actin wurden als pJet-Vektoren in die RT-Q-PCR eingesetzt. Die Kopienzahl wurde wie folgt berechnet:

Gegeben: A = Avogadro-Konstante = $6,023 \times 10^{23}$ Kopien/ mol

D = dsdNMP = 1 bp = 650 g/ mol = 650 Da

P = Plasmidgröße in bp

c = Konzentration in g/ μ L Plasmid-DNA

Gesucht: Kopien/ μ L Plasmid-DNA

Gleichung:

$$\text{Kopien/ } \mu\text{L Plasmid-DNA} = \frac{A [\text{Kopien} \cdot \text{mol}^{-1}] \cdot c [\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}]}{D [\text{g} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{bp}^{-1}] \cdot P [\text{bp}]}$$

3.16.3 Die Überprüfung der Orientierung der CAR-Promotorfragmente in pJET

Bei den unter 3.12.3 hergestellten und „blunt-end“ in pJET klonierten CAR-Promotorfragmente rCARprom4,4, rCARprom2,6 und rCARprom1,9, mußte vor der Religation in das Luciferase-Reportergenplasmid pGL3basic die Orientierung des Fragments in den Plasmidpräparationen geprüft werden. Dazu wurden die Konstrukte mit einem Kontrollverdau unterzogen.

Das Restriktionsenzym zur Überprüfung der Orientierung

pJet-Plasmid	Restriktionsenzym 1	Fragmentlänge bei umgekehrter Orientierung	
pJetrCARprom4,4	<i>Pst</i> I	3,9 kb	
pJetrCARprom2,6	<i>Pst</i> I	2,1 kb	
pJetrCARprom1,9	<i>Bgl</i> II	1,3 kb	
pJetrCARprom2,2_DING	<i>Bgl</i> II	1,5 kb	

Der Verdau von pJetrCARprom4,4 und pJetrCARprom2,6

1x Puffer O	1x	2,5 µL	10x
<i>Pst</i> I	10 U	1 µL	10 U/ µL
pJetrCARprom4,4 bzw. pJetrCARprom2,6		10 µL	-
H ₂ O		ad 25 µL	

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Der Verdau von pJetrCARprom1,9 und pJetrCARprom2,2_DING

1x Puffer O	1x	2,5 µL	10x
<i>Bgl</i> II	10 U	1 µL	10 U/ µL
pJetrCARprom1,9 bzw. pJetrCARprom2,2_DING		10 µL	-
H ₂ O		ad 25 µL	

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Klone die das Plasmid in der gewünschten Orientierung enthielten wurden mit *Xho*I und *Xba*I verdaut und in die *Nhe*I *Xho*I Schnittstelle des pGL3-Vektors religiert.

3.16.4 Der Verdau der Promotorfragmente für die Umklonierung aus pJET in pGL3basic

Die pJet-Plasmide, die die rCAR-Promotorfragmente in der gewünschten Orientierung enthielten (3.16.3), und die rCAR-Promotordeletionsfragmente (3.12.4) wurden vor der Klonierung in pGL3basic erneut mit spezifischen Restriktionsendonukleasen verdaut.

Die Restriktionsenzyme für die der rCARprom-Deletionskonstrukte

<u>Resultierendes Plasmid</u>	<u>Restriktionsenzym 1</u>	<u>Restriktionsenzym 2</u>	<u>Fragmentlänge</u>
rCARprom4,4	<i>XhoI</i>	<i>XbaI</i>	4,4 kb
rCARprom2,6	<i>XhoI</i>	<i>XbaI</i>	2,6 kb
rCARprom1,9	<i>XhoI</i>	<i>XbaI</i>	1,9 kb
pGL3basic	<i>NheI</i>	<i>XhoI</i>	4,8 kb
rCARprom1,9_ΔDR1d_1F	<i>PvuI</i>	<i>BglII</i>	1,6 kb
rCARprom1,9_ΔDR1d_2R	<i>MluI</i>	<i>PvuI</i>	0,3 kb
rCARprom1,9_ΔDR1c_1F	<i>PvuI</i>	<i>BglII</i>	1,0 kb
rCARprom1,9_ΔDR1c_2R	<i>MluI</i>	<i>PvuI</i>	0,9 kb
rCARprom1,9_ΔDR1p_1F	<i>PvuI</i>	<i>BglII</i>	0,5 kb
rCARprom1,9_ΔDR1p_2R	<i>MluI</i>	<i>PvuI</i>	1,4 kb
pGL3basic	<i>MluI</i>	<i>BglII</i>	4,8 kb

Die Verdauungen wurden dann unter folgende Bedingungen ausgeführt.

Verdau A für die Herstellung von pGL3rCARprom4,4, pGL3rCARprom2,6, pGL3rCARprom1,9

2x Tango™	2x	5 µL	10x
<i>XhoI</i>	10 U	1 µL	10 U/ µL
<i>XbaI</i>	20 U	2 µL	10 U/ µL
pJetrCARprom4,4 oder pJetrCARprom2,6 oder pJetrCARprom1,9	5 µg	2 µL	2,5 µg/ µL
H ₂ O		ad 25 µL	

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Verdau B für die Herstellung von pGL3rCARprom4,4, pGL3rCARprom2,6, pGL3rCARprom1,9

1x Tango™	1x	2,4 µL	10x
<i>NheI</i>	20 U	1 µL	10 U/ µL
pGL3basic	5 µg	2 µL	2,5 µg/ µL
H ₂ O		ad 24 µL	

Der Ansatz wurde 1h bei 37 °C inkubiert. Dann wurden weiterhin dazugegeben:

2x Tango™	2x	3 µL	10x
<i>XhoI</i>	10 U	1 µL	10 U/ µL

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Abschluss der PCR wurden die Proben mit 5 µL 6x Loading Dye Solution (MBI-Fermentas) versetzt und komplett auf ein 1 % (w/v) Agarosegel aufgetragen.

Verdau A für die Herstellung der pGL3rCARprom-Deletionskonstrukten

2x Tango™	2x	5 µL	10x
<i>PvuI</i>	10 U	1 µL	10 U/ µL
<i>BglII</i>	10 U	1 µL	10 U/ µL
pJetrCARprom1,9_ΔDR1d_1F	5 µg	2 µL	2,5 µg/ µL
pJetrCARprom1,9_ΔDR1c_1F			
pJetrCARprom1,9_ΔDR1p_1F			
H ₂ O		ad 25 µL	

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Verdau B für die Herstellung der pGL3rCARprom-Deletionskonstrukten

1x Puffer R	1x	2,5 µL	10x
<i>MluI</i>	10 U	1 µL	10 U/ µL
<i>PvuI</i>	10 U	1 µL	10 U/ µL
pJetrCARprom1,9_ΔDR1d_2R	5 µg	2 µL	2,5 µg/ µL
pJetrCARprom1,9_ΔDR1c_2R			
pJetrCARprom1,9_ΔDR1p_2R			
H ₂ O		ad 25 µL	

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Verdau C für die Herstellung der pGL3rCARprom-Deletionskonstrukten

1x Puffer R	1x	2,5 µL	10x
<i>MluI</i>	10 U	1 µL	10 U/ µL
<i>BglII</i>	20 U	2 µL	10 U/ µL
pGL3basic	5 µg	2 µL	2,5 µg/ µL
H ₂ O		ad 25 µL	

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Abschluss wurden die Proben mit 5 µL 6x Loading Dye Solution (MBI-Fermentas) versetzt und komplett auf ein 1 % (w/v) Agarosegel aufgetragen.

3.17 Die Klonierung der Promotorfragmente in pGL3basic

3.17.1 Puffer und Lösungen

10x Ligationspuffer (MBI-Fermentas)

Tris-HCl	400 mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	100 mM
ATP	5 mM

Die Lösung hatte einen pH-Wert von pH 7,8 und war der T4 DNA-Ligase (1U/μL) beigefügt. Sie wurde bei -20 °C gelagert.

TAE-Probenpuffer

Bromphenolblau	0,25 % (w/v)	0,25 g
Glycerol	40 % (v/v)	40 mL
TAE-Puffer (10x)	1x	10 mL
H ₂ O		ad 100 mL

3.17.2 Die Ligation der Promotorfragmente in den pGL3-Basic-Vektor

Der jeweilige geschnittene Vektor und das jeweilige Promotorfragment wurden nun mit Hilfe der T4 DNA-Ligase (MBI Fermentas GmbH) miteinander verbunden. Dieses Enzym katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Reste doppelsträngiger DNA unter ATP-Verbrauch. Ein Ligationsansatz (10 μL) enthielt 1 μL 10x Ligationspuffer, 0,4 μL T4 DNA-Ligase (2 U), 50 ng geschnittener Vektor und maximal 7,5 μL des einzufügenden Promotorabschnitts, der im dreifachen molaren Überschuss zum Vektor vorliegen sollte.

Die Ligationsansätze:

<u>Resultierendes Plasmid</u>	<u>Vektor</u>	<u>Fragment 1</u>	<u>Fragment 2</u>
pGL3rCARprom4,4	pGL3basic (<i>NheI</i> , <i>XhoI</i>) 4,8 kb	rCARprom4,4 (<i>XhoI</i> , <i>XbaI</i>) 4,4 kb	-
pGL3rCARprom2,6	pGL3basic (<i>NheI</i> , <i>XhoI</i>) 4,8 kb	rCARprom2,6 (<i>XhoI</i> , <i>XbaI</i>) 2,6 kb	-
pGL3rCARprom1,9	pGL3basic (<i>NheI</i> , <i>XhoI</i>) 4,8 kb	rCARprom1,9 (<i>XhoI</i> , <i>XbaI</i>) 1,9 kb	-

<u>Resultierendes Plasmid</u>	<u>Vektor</u>	<u>Fragment 1</u>	<u>Fragment 2</u>
pGL3rCARprom1,9_ΔDR1d	pGL3basic (<i>MluI</i> , <i>BglII</i>) 4,8 kb	rCARprom1,9_ ΔDR1d_1F (<i>PvuI</i> , <i>BglII</i>) 1,6 kb	rCARprom1,9_ ΔDR1d_2R (<i>MluI</i> , <i>PvuI</i>) 0,3 kb
pGL3rCARprom1,9_ΔDR1c	pGL3basic (<i>MluI</i> , <i>BglII</i>) 4,8 kb	rCARprom1,9_ ΔDR1c_1F (<i>PvuI</i> , <i>BglII</i>) 1,0 kb	rCARprom1,9_ ΔDR1c_2R (<i>MluI</i> , <i>PvuI</i>) 0,9 kb
pGL3rCARprom1,9_ΔDR1p	pGL3basic (<i>MluI</i> , <i>BglII</i>) 4,8 kb	rCARprom1,9_ ΔDR1p_1F (<i>PvuI</i> , <i>BglII</i>) 0,5 kb	rCARprom1,9_ ΔDR1p_2R (<i>MluI</i> , <i>PvuI</i>) 1,4 kb
pGL3CD2A	pGL3CD2 (<i>PstI</i> , <i>EcoRI</i>) 7,0 kb	CD2A (<i>PstI</i> , <i>EcoRI</i>) 300 bp	-
pGL3CD2B	pGL3CD2 (<i>PstI</i> , <i>EcoRI</i>) 7,0 kb	CD2B (<i>PstI</i> , <i>EcoRI</i>) 330 bp	-
pGL3CD2C	pGL3CD2 (<i>EcoRI</i> , <i>BglII</i>) 7,0 kb	CD2C (<i>EcoRI</i> , <i>BglII</i>) 300 bp	-
pGL3CD2D	pGL3CD2 (<i>EcoRI</i> , <i>BglII</i>) 7,0 kb	CD2D (<i>EcoRI</i> , <i>BglII</i>) 330 bp	-
pGL3CD2E	pGL3CD2C (<i>PstI</i> , <i>EcoRI</i>) 7,1 kb	pGL3CD2A (<i>PstI</i> , <i>EcoRI</i>) 300 bp	-
pGL3C2B1_PPARGmut	pGL3C2B1 (<i>PstI</i> , <i>BglII</i>) 6,8 kb	PPAR_mut (<i>PstI</i> , <i>BglII</i>) 625 bp	-
pGL3C2B1_ER4mut	pGL3C2B1 (<i>PstI</i> , <i>BglII</i>) 6,8 kb	ER4_mut (<i>PstI</i> , <i>BglII</i>) 625 bp	-

Der Ligationsansatz wurde 60 min bei 22 °C inkubiert und dann für 10 min auf 65 °C erhitzt.

3.18 Die Transformation kompetenter *E.coli* XL-1 (blue)-Zellen durch Elektroporation

3.18.1 Puffer und Lösungen

SOB-Medium

Trypton	20 % (w/v)	20 g
Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)	5 g
NaCl	10 mM	600 mg
KCl	2,7 mM	200 mg
H ₂ O		ad 1000 mL

Die Lösung wurde auf pH 7,0 eingestellt, autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

MgCl₂-Stammlösung (2 M)

MgCl ₂	2 M	40,66 g	
H ₂ O		ad 100 mL	

SOC-Medium (1 mL)

SOB-Medium		980 µL	
Glucose	20 mM	10 µL	2 M Stlsg.
MgCl ₂	20 mM	10 µL	2 M Stlsg.

Die Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch angesetzt und auf 37 °C erwärmt.

Elektroporationslösung

Glycerol	10 % (v/v)	100 mL	
H ₂ O		ad 1000 mL	

LB-(Tetra)-Agarplatten

LB-Agar	3,2 % (w/v)	32 g	
Tetracyclin	0,5 % (w/v)	5 g	
H ₂ O		ad 1000 mL	

Die Lösung wurde autoklaviert, auf 46 °C abgekühlt, mit Tetracyclin versetzt und 20 mL pro Petrischale ausplattiert. Die Platten wurden bei 4 °C gelagert.

LB-(Tetra)-Medium

Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)	5 g	
Tetracyclin	0,5 % (w/v)	5 g	
Trypton	1 % (w/v)	10 g	
NaCl	1 % (w/v)	10 g	
H ₂ O		ad 1000 mL	

Das Medium wurde autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

LB-Medium

Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)	5 g	
Trypton	1 % (w/v)	10 g	
NaCl	1 % (w/v)	10 g	
H ₂ O		ad 1000 mL	

Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 7,3 eingestellt und die Lösung unmittelbar nach dem Ansetzen autoklaviert.

Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin	5 mg/ mL	250 mg
H ₂ O		ad 50 mL

Die Lösung wurde durch einen 0,4 µm-Filter sterilfiltriert und in Aliquots bei -20 °C gelagert.

LB-(Amp)-Medium

LB-Medium		5 mL	
Ampicillin	50 µg/ mL	50 µL	5 mg/ mL Stlsg.

LB-(Amp)-Platten

LB-Agar	3,2 % (w/v)	32 g	
Ampicillin	50 µg/ mL	10 mL	5 mg/ mL Stlsg.
H ₂ O		ad 1000 mL	

Die Lösung wurde autoklaviert, auf 46 °C abgekühlt, mit Ampicillin versetzt und 20 mL pro Petrischale ausplattiert. Die Platten wurden bei 4 °C gelagert.

3.18.2 Die Herstellung kompetenter E.coli XL-1 (blue)-Zellen für die Elektroporation

Die Herstellung kompetenter *E. coli* XL-1 (blue) Zellen und die Elektroporation erfolgte nach Dower *et al.* (1988). 5 µL einer Glycerinkultur von *E. coli* XL-1 Zellen wurden auf LB-(Tetra)-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Kolonie in 5 mL LB-(Tetra)-Medium überführt und wiederum über Nacht im Thermoschüttler bei 37 °C inkubiert. Diese 5 mL Bakteriensuspension wurde dann in 250 mL LB-(Tetra)-Medium überführt und bei 37 °C inkubiert, bis die Bakteriensuspension eine optische Dichte von 0,5-1,0 (mittlere logarithmische Wachstumsphase) erreicht hatte. Die Bakterien wurden im Eisbad abgekühlt und 15 min bei 4000 rpm (Hettich Universal 16-Zentrifuge mit Rotor 1617; 25 x g, 4 °C) sedimentiert. Danach wurden die Bakterien mit vorgekühlter Elektroporationslösung einmal mit dem Ausgangsvolumen der ursprünglichen Bakteriensuspension, einmal mit 1/2 Volumen und einmal mit 1/ 20 Volumen Elektroporationslösung gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Bakterien bei 4 °C 15 min bei 4000 rpm (25 x g, 4 °C) zentrifugiert. Am Ende der Waschschrift wurde das Sediment in 1/500 Volumen der ursprünglichen Zellsuspension mit Elektroporationslösung resuspendiert (Zellzahl ca. 10¹⁰/ mL). Es wurden je 50 µL der Zellsuspensionen in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

3.18.3 Die Transformation kompetenter E.coli XL-1 (blue)-Zellen durch Elektroporation

Zur Transformation von Plasmiden in *E. coli* XL-1 (blue) Zellen wurden 50 µL elektrokompeter Zellen während des Auftauens mit 1 µL Ligationsansatz gemischt. Die Zellen wurden in die zuvor gekühlten Transformationsküvetten mit einem Elektrodenabstand

von 2 mm pipettiert und mit einem Puls von 2500 V, einem Widerstand von 200 Ohm und einer Kapazität von 25 μ F elektroporiert. Um das Absterben der Zellen zu minimieren, wurde sofort nach dem Puls 950 μ L auf 37 °C erwärmtes SOC-Medium zu den Zellen gegeben und die Suspension 60 min bei 37 °C im Thermoschüttler inkubiert. Anschließend wurden 100 μ L der Bakteriensuspension auf eine LB-(Amp)-Platte ausgestrichen und 24 h bei 37 °C inkubiert. Da sowohl der pGL3basic- als auch der pJet-Vektor ein Resistenzgen für Ampicillin enthielt, konnten nur transformierte Bakterienklone auf der LB-(Amp)-Platte wachsen. Einige dieser Kolonien wurden mit Hilfe einer Pipette ‚gepickt‘, in 5 mL LB-(Amp)-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde dann isoliert, gereinigt und sequenziert.

3.19 Die Analyse rekombinanter Bakterienkolonien durch Plasmidpräparation im Mini-Maßstab

Die Plasmidpräparation wurde mit dem GFX *Micro* Plasmid Prep-Kit der Firma GE Healthcare nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde dabei durch Affinitäts-Chromatografie über eine Glasfaser-Matrix isoliert und gereinigt.

3.19.1 Puffer und Lösungen

Die Puffer waren im verwendeten Kit enthalten. Sie wurden bei RT gelagert.

Y Tango™ Puffer siehe 3.12.1

Puffer R siehe 3.16.1

Puffer O siehe 3.13.1

Resuspendierungspuffer (Lösung 1)

Tris-HCl (pH 7,5)	100 mM
EDTA	10 mM
RNase I	400 μ g/ mL

Lysispuffer (Lösung 2)

NaOH	1 M
SDS	5,3 % (w/v)

Der Puffer wurde als 5,3-fach konzentrierte Lösung geliefert und wurde mit destilliertem H₂O verdünnt.

Neutralisationspuffer (Lösung 3)

Der Puffer enthielt Acetat und Guanidinhydrochlorid ohne nähere Konzentrationsangaben des Herstellers.

Waschpuffer (Lösung 4)

Der Puffer enthielt Ethanol, NaCl, EDTA und Tris-HCl ohne nähere Konzentrationsangaben des Herstellers.

3.19.2 Die Reinigung von Plasmid-DNA durch Affinitäts-Chromatografie im Mini-Maßstab

Es wurden 2 x 1,5 mL der Übernachtskultur in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß bei 13.000 rpm (Biofuge pico, 16.060 x g) sedimentiert, der Überstand verworfen und das Sediment nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet.

3.19.3 Die spezifische Spaltung der Plasmid-DNA zum Nachweis der erfolgreichen Klonierung

10 µL der Plasmid-DNA wurden in die jeweilige Spaltung eingesetzt. Dazu wurden 2,5 µL 10x Puffer und die jeweiligen Enzyme (siehe unten) pipettiert und das ganze auf 25 µL mit H₂O aufgefüllt. Die Spaltungen wurden 1 h bei 37 °C inkubiert und dann durch Zugabe von 5 µL TAE-Probenpuffer beendet und durch Auftragen auf ein 1 % Agarose-Gel analysiert (3.5). Plasmide, die nach der Spaltung auf dem Agarosegel DNA-Fragmente der richtigen Größe lieferten (siehe unten), wurden anschließend sequenziert.

Der Verdau für einen 25 µL Ansatz

<u>Plasmidspaltung</u>	<u>Restriktions- enzym 1</u>	<u>Restriktions- enzym 2</u>	<u>10 x Puffer</u>	<u>Fragmentgröße</u>
pGL3rCARprom4,4	20 U <i>SacI</i>	20 U <i>HindIII</i>	1x Tango™	4,8 kb und 4,4 kb
pGL3rCARprom2,6	20 U <i>SacI</i>	20 U <i>HindIII</i>	1x Tango™	4,8 kb und 2,6 kb
pGL3rCARprom1,9	20 U <i>SacI</i>	20 U <i>HindIII</i>	1x Tango™	4,8 kb und 1,9 kb
pGL3rCARprom1,2	10 U <i>EcoRI</i>	10 U <i>HindIII</i>	1x Puffer R	5,1 kb und 0,9 kb
pGL3rCARprom1,0	10 U <i>EcoRI</i>	10 U <i>HindIII</i>	1x Puffer R	4,9 kb und 0,9 kb
pGL3rCARprom1,9_ΔDR1d	10 U <i>PvuI</i>	10 U <i>HindIII</i>	1x Puffer R	5,1 kb und 1,6 kb
pGL3rCARprom1,9_ΔDR1c	10 U <i>PvuI</i>	10 U <i>HindIII</i>	1x Puffer R	5,7 kb und 1,0 kb
pGL3rCARprom1,9_ΔDR1p	10 U <i>PvuI</i>	10 U <i>HindIII</i>	1x Puffer R	6,2 kb und 0,5 kb
pGL3CD2A	10 U <i>PstI</i>	10 U <i>EcoRI</i>	1x Puffer O	7,0 kb und 0,3 kb
pGL3CD2B	10 U <i>PstI</i>	10 U <i>EcoRI</i>	1x Puffer O	7,0 kb und 0,33 kb
pGL3CD2C	10 U <i>PstI</i>	10 U <i>EcoRI</i>	1x Puffer O	7,0 kb und 0,3 kb
pGL3CD2D	10 U <i>PstI</i>	10 U <i>EcoRI</i>	1x Puffer O	7,0 kb und 0,3 kb

<u>Plasmidspaltung</u>	<u>Restriktions- enzym 1</u>	<u>Restriktions- enzym 2</u>	<u>10 x Puffer</u>	<u>Fragmentgröße</u>
pGL3CD2E	10 U <i>Pst</i> I	10 U <i>Eco</i> RI	1x Puffer O	7,1 kb und 0,3 kb
pGL3C2B1_PPARGmut	10 U <i>Pst</i> I	10 U <i>Bgl</i> II	1x Puffer O	6,8 kb und 0,6 kb
pGL3C2B1_ER4mut	10 U <i>Pst</i> I	10 U <i>Bgl</i> II	1x Puffer O	6,8 kb und 0,6 kb

3.20 Die Sequenzierung der Promotorkonstrukte mit dem Kapillarelektrophorese-Sequenziergerät

3.20.1 Das Prinzip

Die Sequenzierung des Promotorkonstruktes wurde mit dem Kapillarelektrophorese-DNA-Sequenziergerät der Firma Beckman Coulter (Model CEQ™ 2000 XL) durchgeführt. Es wurde das ‚CEQ™ Dye Terminator Cycle Sequencing‘-Kit der Firma Beckman Coulter entsprechend der Herstellervorschrift angewendet. Bei dieser Methode wurden vier mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen gekoppelte 2',3'-Dideoxyribonukleosid-Triphosphate (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP; CEQ Dye Terminatoren), die bei unterschiedlicher Wellenlänge fluoreszieren, mit nicht-markierten Desoxyribonukleosid-Triphosphaten, Sequenzierungspuffer, Plasmid, nicht-markiertem Oligonukleotid und DNA-Polymerase gemischt und eine zyklische verlaufende Sequenzierung durchgeführt. Bei diesem Verfahren wurde jeweils lediglich ein Oligonukleotid eingesetzt, so dass nur ein Strang immer wieder abgeschrieben wurde. Die Dideoxyribonukleosid-Triphosphate führten statistisch nach unterschiedlich langer Polymerase-Reaktion zum Kettenabbruch, da ihnen das 3'-Hydroxyl-Ende fehlte, um die nächste Phosphodiesterbindung zu knüpfen. Auf diese Weise entstand ein Gemisch aus DNA-Fragmenten, die sich in ihrer Länge um ein Basenpaar unterschieden. Diese am 3'-Ende mit Basen-spezifischen Farbstoffen markierten DNA-Fragmente wurden denaturiert, im Kapillarelektrophorese-DNA-Sequenziergerät elektrophoretisch aufgetrennt und durch ihre Fluoreszenz im Gel nachgewiesen.

3.20.2 Puffer und Lösungen

Das Sequenzierungsgemisch ‚SEQ-Mix‘ und die Sample Loading Solution waren im CEQ™ Dye Terminator Cycle Sequencing-Kit enthalten. Die Sample Loading Solution bestand aus deionisiertem Formamid. Über die Zusammensetzung des SEQ-Mixes machte der Hersteller keine Angaben. Die Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

Glycogen -Lösung (20 mg/ mL)

Glycogen	20 mg/ mL	20 mg
H ₂ O		ad 1 mL

Natriumacetat-Stammlösung (3 M)

Natriumacetat	3 M	2,46 g
H ₂ O		ad 10 mL

DNA-Fäll-Lösung

Glycogen -Lösung	20 mg/ mL	1 µL	
Natriumacetat	1,2 M	2 µL	3 M Stlsg.
EDTA	40 mM	0,4 µL	0,5 M Stlsg.
H ₂ O		1,6 µL	

Die Lösung wurde erst unmittelbar vor Gebrauch angesetzt.

Eine Trenngelkartusche CEQ™-Trenngel I wurde vom Hersteller mitgeliefert und enthielt 10 mL gepufferte Polyacrylamid-Siebmatrix mit Harnstoff ohne genauere Angaben der Zusammensetzung.

Der Trennpuffer CEQ™ wurde vom Hersteller mitgeliefert und enthielt als wirksame Bestandteile < 10 % organische Puffersalze ohne genauere Angaben der Zusammensetzung.

3.20.3 Die Sequenzierungsreaktionen und Aufarbeitung der Sequenzierproben

Ein Sequenzierungsansatz enthielt 5 µL (etwa 750 ng) des gereinigten Plasmids als DNA-Matrize. Der Ansatz wurde für 1 min auf 95 °C erhitzt und dann 1 µL des betreffenden Oligonukleotids (1,6 pmol, RV3 und GL2 bei pGL3basic und pJet1_F und pJet1_R bei pJet) und 4 µL des SEQ-Mixes zugegeben. Das 10 µL-Gemisch durchlief nun im Thermocycler (Modell T300 von Biometra) 30 Zyklen, die sich aus 20 s Denaturierung bei 96 °C, 20 s Primeranlagerung bei 50 °C und 4 min Kettenverlängerung bei 60 °C zusammensetzten. Nach Abschluss der Sequenzierungsreaktion wurde der Reaktionsansatz auf 4 °C abgekühlt und die DNA gefällt. Dazu wurden zu den 10 µL des Sequenzieransatzes 2,5 µL DNA-Fäll-Lösung und 30 µL Ethanol (95 % (v/v), -20 °C) gegeben. Dann wurde die Probe gevortext, 20 min bei 10.000 x g (SIGMA 1215/4-H Rotor, SIGMA 3K30 Zentrifuge; 4 °C) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 100 µL 70% (v/v) Ethanol (-20 °C) resuspendiert und erneut unter den gleichen Bedingungen für 5 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, das Sediment 15 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 40 µL Sample Loading Solution aufgenommen. Die DNA-Proben wurden 10 min bei RT inkubiert und danach in Vertiefungen einer 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert, mit Parafinöl überschichtet und in den Kapillarelektrophorese-Sequenzierer gestellt, wo sie denaturiert und dann auf das Trenngel innerhalb der Kapillaren aufgetragen wurden. Die Polynukleotide wurden elektrophoretisch der Größe nach im Gel aufgetrennt. Die vier unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffgruppen, die jeweils an ein bestimmtes Nukleotid gekoppelt waren,

wurden durch einen Infrarot-Diodenlaser angeregt. Durch ein Detektorsystem des DNA-Sequenzierers konnten die vier Fluoreszenz-Wellenlängen anhand ihrer unterschiedlichen Emissions-Wellenlänge identifiziert und quantifiziert werden.

3.21 Die Isolierung der Plasmid-DNA im Maxi-Maßstab

Die Präparation wurde mit dem ‚JETSTAR 2.0 Plasmid Maxiprep‘-Kit der Firma GENOMED GmbH nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Es handelte sich dabei ebenfalls um eine Affinitäts-Chromatografie.

3.21.1 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Lösungen waren im Kit enthalten.

Resuspendierungspuffer (Lösung 1)

Tris	50 mM
EDTA	10 mM
RNase	100 µg/ mL

Der Puffer hatte einen pH-Wert von 8,0 und wurde bei 4 °C gelagert.

Lysispuffer (Lösung 2)

NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v)

Der Puffer wurde bei RT gelagert.

Neutralisationspuffer (Lösung 3)

Kaliumacetat	3,1 M
--------------	-------

Der Puffer hatte einen pH-Wert von 5,5 und wurde bei RT gelagert.

Waschpuffer (Lösung 4)

NaCl	800 mM
Natriumacetat	100 mM

Der Puffer hatte einen pH-Wert von 5,0 und wurde bei RT gelagert.

Elutionspuffer (Lösung 5)

NaCl	1250 mM
Tris	100 mM

Der Puffer hatte einen pH-Wert von 8,5 und wurde bei RT gelagert.

Äquibrierungspuffer (Lösung 6)

NaCl	600 mM
Natriumacetat	100 mM
TritonX-100	0,15 %

Der Puffer hatte einen pH-Wert von 5,0 und wurde bei RT gelagert.

3.21.2 Die Isolierung der Plasmid-DNA durch Affinitäts-Chromatografie im Maxi-Maßstab

Es wurden 150 mL LB-(Amp)-Medium mit 2 mL transformierter *E. coli* XL-1-Bakterienkultur angeimpft und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde dann 15 min bei 6000 rpm (SORVALL-Zentrifuge, Rotor SORVALL SLA-1500; 3685 x g, 4 °C) sedimentiert. Das Pellet wurde nach Anweisung des Herstellers aufgearbeitet und die Plasmid-DNA isoliert. Zur photometrischen Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration wurden 10 µL der DNA-Lösung in 500 µL H₂O verdünnt und die optische Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{DNA-Konzentration} = \Delta E_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnung} \times 50 \mu\text{g/ mL.}$$

Die Reinheit wurde durch Quotientenbildung der OD 260 nm zur OD 280 nm errechnet. Eine ausreichende Reinheit wurde durch einen Quotienten OD 260 nm / OD 280 nm > 1,8 definiert.

3.22 Die Untersuchung des zentralen DR1-Motiv des CAR-Promotors der Ratte mit Hilfe des EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

FRIED *et al.* beschrieben 1981 als Erste die Methode des so genannten *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA). Die Wechselwirkungen zwischen dem zentralen DR1-Consensus-Motiv aus dem CAR-Promotor mit möglichen bindenden Transkriptionsfaktoren wurden in Anlehnung an das Verfahren nach BAUER *et al.* (2001) untersucht. Alle Arbeiten mit ³²P-α dCTP wurden freundlicherweise durch Christoph Schmitz-Salue und Prof. G.-P. Püschel durchgeführt.

3.22.1 Puffer und Lösungen

Alle anderen verwendeten Puffer wurden unter 3.2.1 aufgeführt.

10x Reaktionspuffer (Klenow) (MBI-Fermentas) siehe 3.12.1

Klenow Fragment (10 U/ µL) siehe 3.12.1

SuRE/cut Puffer H (Roche)

Tris-HCl (pH 7,5)	500 mM
MgCl ₂	100 mM
NaCl	1 M
DTE	10 mM

Puffer A

HEPES	10 mM	120 mg
KCl	10 mM	35 mg
MgCl ₂	1,5 mM	5 mg
DTT	0,5 mM	4 mg
H ₂ O		ad 50 mL

Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 N KOH auf pH 7,9 eingestellt.

Puffer C

HEPES	20 mM	240 mg	
NaCl	420 mM	1,225 g	
MgCl ₂	1,5 mM	5 mg	
DTT	0,5 mM	4 mg	
EDTA	0,2 mM	3 mg	
Glycerol	50 %(v/ v)	25 mL	100 %(v/ v)
H ₂ O		ad 50 mL	ad 50 mL

Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 N NaOH auf pH 7,9 eingestellt.

Vor Gebrauch wurden dem Lysispuffer pro mL frisch zugesetzt:

Pefablock	200 µM	1 µL	200 mM Stlsg.
Leupeptin	10 µg/ mL	1 µL	10 mg/ mL Stlsg.
Trypsin-Inhibitor	10 µg/ mL	1 µL	10 mg/ mL Stlsg.

TE-Puffer _siehe 3.12.110 x TBE

Tris	0,89 M	53,890 g
Borsäure	0,89 M	27,500 g
EDTA	20 mM	2,922 g
H ₂ O		ad 500 mL

Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 N NaOH auf pH 8,3 eingestellt.

Auftragungspuffer

Bromphenolblau	0,5 % (w/v)	250 mg
Glycerol	50 % (w/v)	25 g
H ₂ O		ad 50 mL

Der Puffer wurde bei -20 °C gelagert.

GRAB50 (Gel Retardation Assay Buffer)

Tris	100 mM	1 mL	1 M Stlsg.
KCl	500 mM	1,863 g	
EDTA	10 mM	1 mL	0,5 M Stlsg.
Glycerol	50 % (w/v)	25 g	
H ₂ O		ad 50 mL	

Der pH-Wert der Lösung wurde vor Glycerolzugabe mit 1 N HCl auf pH 7,6 eingestellt. Der Puffer wurde bei -20 °C gelagert

Oligonukleotide

CAR-EMSA-F 100 pmol/ µL

CAR-EMSA-R 100 pmol/ µL

Poly dIdC (1 µg/ µL) Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

3.22.2 Die Kultivierung der Hepatozyten

Kultivierte Hepatozyten (3.2.4) wurden nach 4 h in Kultur für die Dauer des Experiments in Williams E Kulturmedium inkubiert. Die Hepatozyten wurden nicht anderweitig behandelt.

3.22.3 Die Kernextraktion von Hepatozyten der Ratte

Die Hepatozyten von je 4 Kulturschalen mit je 1×10^6 Zellen wurden auf Eis mit einem Zellschaber in 800 µL 1 x PBS in ein Schnappdeckelreaktionsgefäß überführt und bei 50 x g 5 min bei 4 °C (SIGMA, Rotor 12154-H) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 800 µL kaltem hypotonen Puffer A resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 50 µL einer 10 %igen Nonidet-NP-40 Lösung zugesetzt und die angeschwollenen Zellen mit 12 Hüben bei 1400 rpm im Glas-Homogenisator aufgebrochen. Die intakten Zellkerne wurden nun 10 min bei 2000 x g und 4 °C pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µL kaltem Puffer C resuspendiert 30 min heftig im Kühlraum (4 °C) geschüttelt und im Anschluss 10 min bei 20.000 x g und 4 °C (SIGMA, Rotor 12154-H) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert. Der Proteingehalt

wurde nach LOWRY bestimmt (3.4.3).

3.22.4 Der Nachweis spezifischer Kernprotein-DNA-Wechselwirkungen (EMSA)

Zunächst wurden sowohl radioaktiv markiertes, doppelsträngiges Oligonukleotid als auch unmarkiertes Oligonukleotid hergestellt. Dazu wurden die Einzelstränge nach folgendem Protokoll zusammenpipettiert und nach Erhitzen auf 95 °C langsam abgekühlt um eine Doppelstrangpaarung zu ermöglichen.

<u>Doppelstrangpaarung</u>	Zu markierendes Oligonukleotid ≈3 pmol/ μL	Unmarkiertes Oligonukleotid ≈10 pmol/ μL
CAR-EMSA-F	3 μL	10 μL
CAR-EMSA-R	3 μL	10 μL
Puffer H	10 μL	10 μL
H ₂ O	84 μL	70 μL

Das PCR-Programm: 10 min 95 °C, 1 min 94,8 °C und dann schrittweise Abkühlung von 0,2 °C/ min bis auf 15 °C im Thermocycler.

Radioaktive Markierung

c≈ 0,57 pmol/ μL

Zu markierendes doppelsträngiges Oligonukleotid	11,5 μL	3 pmol/ μL
dNTP (dATP, dTTP, dGTP)	2,5 μL	2 mM
Klenowpuffer	2 μL	10 x
Klenow	0,1 μL	10 U/ μL
³² P-α dCTP	4 μL	10 μCi/ μL

Der Ansatz wurde 15 min bei RT inkubiert, mit 40 μL TE-Puffer versetzt und dann mittig auf die Schräge einer zuvor 1 min bei 735 x g und RT (SIGMA, Rotor 12154-H) zentrifugierten G-25-Säule (Amersham) pipettiert. Die Säule wurde für 2 min bei 735 x g und RT (SIGMA, Rotor 12154-H) zentrifugiert und der Durchlauf, welcher das markierte Oligonukleotid enthielt, aufgefangen. Dann wurde zunächst das nicht denaturierende Gel zwischen die vorbereiteten Trägerglasplatten (Biometra 110 x 120 x 1 mm) gegossen, der Kamm (Taschen: 20 x 5 x 1 mm) eingesetzt und es so etwa 1 h auspolymerisiert. Nach dem Entfernen des Kammes und vor Probenbefüllung wurde das Gel in die Gelkammer eingesetzt mit 0,5 x TBE überschichtet und unter Kühlung etwa 1 h bei 10 mA auf die spätere Elektrophorese vorbereitet.

EMSA-Gel

8 % (w/v) PAA

Acrylamid (Rotiphorese 29:1, 40%)	5 mL
H ₂ O	18,75 mL
10 x TBE	1,25 mL
Ammoniumpersulfat (10 % (w/v) Stlsg.)	750 µL
TEMED	75 µL

Währenddessen wurden die EMSA-Reaktionen vorbereitet. Dazu wurden 7 Ansätze wie folgt bestückt.

EMSA-Reaktion

GRAB50	2 µL	
DTT	1 µL	20 mM
Poly dIdC 1	1 µL	1 µg/ µL
Kernextrakt	10 µL	

Dann wurden je 10 µL H₂O bzw. Kompetitor zugesetzt.

EMSA-Reaktion

<u>EMSA-Reaktion</u>	Zusatz von 10 µL	Konzentration
Ansatz 1	H ₂ O	
Ansatz 2	unmarkiertes Oligonukleotid	≈10 pmol/ µL
Ansatz 3	pGl3basic	1,5 µg/ µL
Ansatz 4	pGl3rCARprom1,9	1,5 µg/ µL
Ansatz 5	pGL3rCARprom1,9_ΔDR1d	1,5 µg/ µL
Ansatz 6	pGL3rCARprom1,9_ΔDR1c	1,5 µg/ µL
Ansatz 7	pGL3rCARprom1,9_ΔDR1p	1,5 µg/ µL

Die EMSA-Reaktionen wurden nun vorab 30 min bei RT inkubiert, anschließend mit 2 µL markiertem Oligonukleotid versetzt und weitere 30 min bei RT inkubiert. Vor dem Auftragen der Proben auf das bereits vorbereitete EMSA-Gel wurden die EMSA-Reaktionen mit 2 µL Auftragungspuffer gemischt. Zum Einlaufen der Proben in das Gel wurde die Elektrophorese mit 6 mA gestartet und dann für 3 h bei 10 mA unter ständiger Kühlung fortgesetzt, bis die blaue Front die Unterkante des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde danach von den Glasplatten getrennt und mit 0,5 x TBE gespült um radioaktiv kontaminierte Flüssigkeit zu beseitigen. Das Gel wurde auf Filterpapier gelegt mit Folie abgedeckt und im Vakuum (10-20 mbar) für circa 1h bei 60 - 80 °C getrocknet. Der Nachweis der Banden erfolgte durch Exponieren ³²P-sensitiver Platten wie bei dem RNA-Nachweis (3.11.5) für 1-24 h.

3.23 Die Untersuchung zur Bindung von PPAR α an das zentrale DR1-Motiv durch Chromatin-Immunpräzipitation

3.23.1 Puffer und Lösungen

Alle anderen verwendeten Puffer wurden unter 3.2.1 und 3.22.1 aufgeführt.

SDS-Lysis-Puffer

SDS	0,5 % (w/v)	2,5 mL	10% (w/v) Stlsg.
EDTA	10 mM	1 mL	0,5 M Stlsg.
Tris	50 mM	303 g	
H ₂ O		ad 50 mL	

Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 N HCl auf pH 8,1 eingestellt.

10-fach Dilutionspuffer

SDS	0,01 % (w/v)	50 μ L	10% (w/v) Stlsg.
EDTA	1,2 mM	119 μ L	0,5 M Stlsg.
Tris	16 mM	97 g	
NaCl	160 mM	468 g	
Triton-X-100	1 % (w/v)	500 μ L	10% (w/v) Stlsg.
H ₂ O			ad 50 mL

Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 N HCl auf pH 8,1 eingestellt. Vor Gebrauch wurden dem Lysispuffer pro mL frisch zugesetzt:

Pefablock	200 μ M	1 μ L	200 mM Stlsg.
Leupeptin	10 μ g/ mL	1 μ L	10 mg/ mL Stlsg.
Trypsin-Inhibitor	10 μ g/ mL	1 μ L	10 mg/ mL Stlsg.

Waschpuffer 1

SDS	0,1 % (w/v)	500 μ L	10% (w/v) Stlsg.
EDTA	2 mM	200 μ L	0,5 M Stlsg.
Tris	20 mM	121 mg	
NaCl	150 mM	438 mg	
Triton-X-100	1 % (w/v)	500 μ L	10% (w/v) Stlsg.
H ₂ O		ad 50 mL	

Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 N HCl auf pH 8,1 eingestellt.

Waschpuffer 2

SDS	0,1 % (w/v)	1 mL	10% (w/v) Stlsg.
EDTA	2 mM	400 µL	0,5 M Stlsg.
Tris	20 mM	242 mg	
NaCl	500 mM	2922 mg	
Triton-X-100	1 % (w/v)	1 mL	10% (w/v) Stlsg.
H ₂ O		ad 100 mL	

Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 N HCl auf pH 8,1 eingestellt.

TE-Puffer siehe 3.12.1

Protein-G-Sepharose

Protein-G-Sepharose	50 % (w/v)	5 g	
TE-Puffer		ad 10 mL	

Elutionspuffer

SDS	1 % (w/v)	1 mL	10% (w/v) Stlsg.
NaHCO ₃	100 mM	84 mg	
H ₂ O		ad 10 mL	

Dieser Puffer wurde stets direkt vor Gebrauch hergestellt.

NaCl-Lösung

NaCl	5 M	2,922 g	
H ₂ O		ad 10 mL	

Oligonukleotide

CAR-ChIP-1cF 10 pmol/ µL

CAR-ChIP-2cR 10 pmol/ µL

Qiagen Nucleotide Removal Kit

PN-Puffer, PE-Waschpuffer, EB-Puffer

Der Hersteller machte keine Angaben zu der Zusammensetzung der einzelnen Puffer.

3.23.2 Die Kultivierung und Aufarbeitung der Hepatozyten

Kultivierte Hepatozyten (3.2.4) wurden nach 4 h in Williams E-Kulturmedium inkubiert. Nach 22 h wurden die Hepatozyten für 2 h mit WY 14643 (10 µM) behandelt. Dann erfolgte die

Vernetzung der DNA mit Proteinen durch Zugabe von 1 % (v/v) Formaldehyd. Nach 10 min Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden die Zellen bei 4 °C zweimal mit 2 mL eiskaltem 1x PBS gewaschen, in je 100 µL SDS-Lysispuffer abgeschabt und in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß vereinigt. Die Lysate wurden dann auf Eis mit dem Ultraschallstab (Einstellung: Power 40% (Amplitude), Cycle 4 (Puls: 0,4 s Arbeit, 0,6 s Ruhe); maximale Frequenz 20 kHz; Leistung: 70 W) 6 x 10 s sonifiziert, um die genomische DNA in 400 bis 600 bp große Fragmente zu zerstückeln. Dann wurden die Lysate 15 min bei 10.000 g und 4 °C (SIGMA, Rotor 12154-H) sedimentiert, die Überstände vereinigt und jeweils 200 µL in die Immunpräzipitation eingesetzt. Der restliche Überstand wurde für die Gewinnung genomischer DNA für die PCR-*Input*-Kontrolle bei -70 °C aufbewahrt.

3.23.3 Die Immunpräzipitation von PPAR α

Die Immunpräzipitation wurde zum einen mit einem PPAR α spezifischen als auch mit einem unspezifischen IgG durchgeführt. Außerdem wurde zur Bestimmung des Hintergrundes eine Immunpräparation ohne IgG angesetzt. Daher werden jeweils 200 µL Lysat und 1,8 mL 10-fach Dilutionspuffer in eines von drei 2 mL Schraubdeckelgefäßen überführt und die Suspension mit 80 µL Protein-G-Sepharose für 30 min bei 4 °C unter Rotation vorgereinigt, um während der Immunpräzipitation unspezifische Bindung an die Sepharose möglichst gering zu halten. Die Schraubdeckelgefäße wurden dann 1 min bei 1000 rpm und 4 °C (SIGMA, Rotor 12154-H) zentrifugiert und der Überstand in ein neues Schraubdeckelgefäße überführt. 10 µg PPAR α Antikörper (Kaninchen-Anti-Ratte-IgG SantaCruz sc9000x), EP3-N-Terminus IgG bzw. kein IgG wurden hinzupipettiert und die neuen Schraubdeckelgefäße über Nacht bei 4 °C rotiert. Am darauf folgenden Tag wurden 60 µL Protein-G-Sepharose dazugegeben und die Schraubdeckelgefäße weitere 2 h bei 4 °C rotiert, um den Antikörper-DNA-Komplex an die Protein-G-Sepharose zu binden. Die Schraubdeckelgefäße wurden im Anschluss 1 min bei 1000 rpm und 4 °C (SIGMA, Rotor 12154-H) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sepharose-Pellets wurde nun in mehreren Waschschritten, d.h. zunächst einmal mit Waschpuffer 1, zweimal mit Waschpuffer 2 und dann zweimal mit TE-Puffer, in 1 mL 5 min bei 4 °C rotiert gereinigt und dann 1 min bei 1000 rpm und 4 °C (SIGMA, Rotor 12154-H) sedimentiert. Nach dem letzten Waschschriff mit TE-Puffer wurden die Sepharose-Pellets 15 min bei RT mit 200 µL Elutionspuffer, der eine hohe SDS-Konzentration aufwies, inkubiert, 1 min bei 1000 rpm und 4 °C (SIGMA, Rotor 12154-H) sedimentiert und der Überstand, welcher nun die Protein-DNA-Komplexe enthielt, in ein 1,5 mL Schraubdeckelgefäß überführt. Die Elution wurde wiederholt und die Überstände vereinigt zu 400 µL. Dann wurden 16µL NaCl-Lösung dazu pipettiert und die Schraubdeckelgefäße 6 h bei 65 °C inkubiert, um die Vernetzung von DNA und Protein aufzubrechen.

3.23.4 Die Aufreinigung der genomischen DNA aus den Immunpräzipitaten

Zur Aufreinigung der genomischen DNA-Fragmente aus dem Immunpräzipitaten wurde das „Nucleotide Removal Kit“ der Firma Qiagen benutzt. Zunächst wurden 400 µL Eluat mit 2000 µL PN-Puffer (3 Proben: PPAR α IgG, Kontroll-IgG und ohne IgG) und 100 µL Input-Kontrolle mit 500 µL PN-Puffer (4. Probe) gemischt. Die Aufreinigung erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Das Eluat enthielt die Fragmente der genomischen DNA. Das Mitführen der Input-Kontrolle dient zum einen zum Nachweis der erfolgreichen DNA-Aufreinigung und zum anderen zur Überprüfung der Fragmentlänge nach der Sonifizierung.

3.23.5 Der Nachweis der Bindung von PPAR α an das zentrale DR1-Motiv durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR-Protokoll: 3 min 95 °C; 45 x (1 min 95 °C, 1 min 55 °C, 1 min 72 °C); 10 min 72 °C

Matrize: ChIP-Eluate

	<u>.sense'-</u>	<u>.antisense'-</u>	<u>PCR-Produkt</u>
<u>PCR-Produkt</u>	<u>Oligonukleotide</u>	<u>Oligonukleotide</u>	
CAR cDR1	CAR-ChIP-1cF	CAR-ChIP-2cR	~250 bp

PCR-Mix für eine Probe:

Puffer (Bioline)	1x	2,5 µL	10x
dNTPs	0,2 mM	2,5 µL	2 mM
MgCl ₂	3 mM	1,5 µL	50 µM
ChIP-Eluate		5 µL	
Sense-Oligonukleotid	6 µM	1,5 µL	10 µM
Antisense-Oligonukleotid	6 µM	1,5 µL	10 µM
BIOTAQ Red™ DNA-Polymerase	1 U	1 µL	1 U/µL
H ₂ O		ad 25 µL	

Nach Abschluss der PCR wurden die Proben mit 5 µL 6x Loading Dye Solution (MBI-Fermentas) versetzt und komplett auf ein 2 % (w/v) Agarosegel aufgetragen, getrennt (3.15.2) und die Banden des PCR-Produkts detektiert.

TIERVERSUCH

3.24 Die CYP2B-Aktivität *in vivo* in Abhängigkeit von der Phenobarbital-Konzentration

Die Gültigkeit der *in vitro* in Hepatozyten gewonnenen Erkenntnisse *in vivo*, sollten nun im Ganztier untersucht werden. Da schon eine geringe Exposition mit CAR-aktivierenden

Fremdstoffen ausschlaggebend für den beobachteten PPAR α -Effekt sein könnte, wurde zunächst die Schwellendosis von Phenobarbital ermittelt, bei der es gerade zu einer Steigerung der CYP2B1-Expression kam.

3.24.1 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden die Puffer unter 3.4.1 und 3.6.1 beschrieben.

Physiologische NaCl-Lösung siehe 3.1.1

Phenobarbital-Lösung für die i.p. Applikation

Dosisgruppe	mg PB/ mL 0,9% NaCl	mg/ kg*KM
0	0	0
1	0,25	0,8
2	1	3,1
3	2	6,3
4	4	12,5
5	8	25,0
6	16	50,0
7	25,6	80,0

Da Phenobarbital bei neutralem pH ausfällt war auf einen leicht basischen pH zu achten (pH 8). Die Lösungen wurden durch einen 0,4 μ m-Filter sterilfiltriert.

3.24.2 Tiere und Tierhaltung während des Versuchs

Die Tiere und die Tierhaltung sind unter 2.1 beschrieben worden. Unter diesen Haltungsbedingungen wurde für den Versuch drei männliche Wistar-Ratten pro Phenobarbitaldosis (0; 0,8; 3,1; 6,3; 12,5; 25; 50 oder 80 mg PB/ kg KM), an drei aufeinanderfolgenden Tagen, i.p. Phenobarbital injiziert. Am vierten Tag wurden die Ratten mit Ether narkotisiert und die Lebern entnommen. Jeweils der große Leberlappen wurde für die Mikrosomengewinnung in KBS-Puffer auf Eis überführt und direkt aufgearbeitet, die restlichen Leberlappen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.24.3 Die Mikrosomenpräparation

Die Mikrosomenpräparation erfolgte mit den gleichen Puffern wie in 3.4 beschrieben. Da es sich um Leber und nicht um Hepatozytenkultur handelte, wich die Aufarbeitung von der unter in 3.4 beschriebenen ab. Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Der große

Leberlappen wurde mit einer Schere in wenig KBS-Puffer sehr gründlich zerkleinert. Dann wurde die Suspension mit KBS-Puffer so aufgefüllt, dass ein Verhältnis von 1 g Leber zu 5 mL KBS-Puffer vorlag. Im Anschluss wurde die zerstückelte Lebersuspension mit einem Potter vorsichtig zertrümmert und mit zehn Hüben und Stößen zu einer homogenen Masse verarbeitet. Das Leberhomogenat wurde 20 min bei 10.000 rpm (SORVALL-Zentrifuge, Rotor SORVALL SS-34; 9.000 x *g*, 4 °C) zentrifugiert. Im Überstand befand sich der S9-Mix. Dieser enthielt die Mikrosomen und wurde dann in Eppendorfgefäße überführt, austariert und 1 h bei 40.000 rpm (Beckmann-Zentrifuge, Rotor Beckmann Type 90 Ti; 100.000 x *g*, 4 °C) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µL Mikrosomen-Puffer aufgenommen, resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

3.24.4 Die CYP2B-Aktivität *in vivo* in Abhängigkeit von der Phenobarbitalkonzentration

Die CYP2B-abhängige 7-Pentoxyresorufindepentylisierung wurde gemessen (3.6). Die Mikrosomen wurden jedoch 1:10 verdünnt (10 µL Mikrosomen + 90 µL Mikrosomenpuffer) in die Messung eingesetzt.

3.25 Der Einfluss des PPAR α -Agonisten WY 14643 auf die CYP2B-Aktivität und CAR-Expression *in vivo* in Leber der Ratte

Bei einer i.p. Applikation von 3,13 mg / kg KM an drei aufeinander folgenden Tagen kam es zu einer gerade messbaren Induktion der Aktivität des CAR-Zielgens CYP2B in Rattenleber. Im folgenden Versuch wurde nun untersucht, ob PPAR α -Agonisten nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* die CAR-Expression und die CYP2B1-Aktivität steigern.

3.25.1 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden die Puffer unter 3.4.1, 3.6.1 und 3.24.1 beschrieben.

Phenobarbital-Lösung für die i.p. Applikation am 1. und 2. Tag

Dosisgruppe	mg/ mL 0,9% NaCl	mg/ kg*KM
0	0	0
1	1	3,1

Bei dem Herstellen der Lösungen ist darauf zu achten, dass das Phenobarbital im neutralen ausfällt, daher war die Lösung leicht basisch (pH 8). Sie wurden durch einen 0,4 µm-Filter sterilfiltriert.

Phenobarbital-Lösung für die i.p. Applikation am 3. Tag

Dosisgruppe	mg PB/ mL 0,9% NaCl: DMSO (50:50)	mg/ kg*KM	mg WY 14643/ mL 0,9% NaCl: DMSO (50:50)	mg/ kg*KM
0A	0	0	0	0
0B	0	0	16	50
1A	1	3,1	0	0
1B	1	3,1	16	50

Bei dem Herstellen der Lösungen ist darauf zu achten, dass Phenobarbital nicht ausfällt, daher war die Lösung leicht basisch (pH 8). Sie wurden durch einen 0,4 µm-Filter sterilfiltriert.

3.25.2 Die Tiere und die Tierhaltung während des Versuchs

Generell sind die Tiere und die Tierhaltung unter 2.1 beschrieben worden. Unter diesen Haltungsbedingungen wurde für den Versuch je sechs männliche Wistar-Ratten pro Phenobarbitaldosis (0 (Gruppe 0) oder 3,1 mg PB/ kg KM (Gruppe 1)), an zwei aufeinanderfolgenden Tagen, i.p. Phenobarbital injiziert. Am dritten Tag wurden je drei Tieren pro Gruppe zusätzlich DMSO (Gruppe 0A und 1A) bzw. 50 mg WY 14643/ kg KM (Gruppe 0B und 1B) i.p. verabreicht. Am vierten Tag wurden die Ratten mit Ether narkotisiert und die Lebern entnommen. Es fiel auf das der Bauchraum stark gerötet war, was auf die DMSO-Konzentration zurückzuführen sein könnte. Jeweils der große Leberlappen wurde für die Mikrosomengewinnung in KBS-Puffer auf Eis überführt und direkt aufgearbeitet, die restlichen Leberlappen wurden zur RNA-Gewinnung in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.25.3 Die Mikrosomenpräparation

Die Mikrosomenpräparation wurde unter 3.24.3 beschrieben.

3.25.4 Der Einfluss von WY 14643 auf die PB-abhängige CYP2B-Aktivität *in vivo*

Die CYP2B-abhängige 7-Pentoxyresorufindepentylisierung wurde gemessen (3.6). Die Mikrosomen wurden jedoch 1:10 verdünnt (10 µL Mikrosomen + 90 µL Mikrosomenpuffer) in die Messung eingesetzt.

3.25.5 Der Einfluss von WY 14643 auf die CAM-Expression *in vivo*

30 mg Rattenleber wurden in flüssigem Stickstoff zermörsert und in 175 µL RNA-Lysis-Puffer lysiert. Die mRNA wurde isoliert (3.9), in cDNA umgeschrieben und in die RT-Q-PCR eingesetzt (3.10).

3.26 Der Einfluss von Olivenöl und Fischöl auf die CAR-mRNA-Expression *in vivo* in Leber der Ratte

Es ist bekannt, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie sie im Fischöl vorkommen, PPAR α , als natürlich vorkommende Liganden, sehr gut aktivieren können. Ziel des Versuches war es, die CAR-mRNA-Expression nach Verfütterung von Fettsäuren zu beobachten.

3.26.1 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden die Puffer unter 3.4.1, 3.6.1 und 3.24.1 beschrieben.

Fischöl wurde unter der Bestellnummer F8020 bei Sigma-Aldrich bezogen. Und bei 4 °C gelagert.

Olivenöl wurde unter der Bestellnummer 75348 bei Sigma-Aldrich (Fluka) bezogen. Und bei 4 °C gelagert.

3.26.2 Tiere und Tierhaltung während des Versuchs

Generell sind die Tiere und die Tierhaltung unter 2.1 beschrieben worden. Das Futter wurde morgens entfernt. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser. Unter diesen Haltungsbedingungen wurde für den Versuch 3 Gruppen (Kontrolle, Olivenöl- und Fischöl-Gruppe) von je fünf männlichen Wistar-Ratten (circa 300g KM) gebildet. Die Olivenöl- und Fischöl-Gruppe bekamen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen nachmittags je 2 mL Öl per Schlundsonde verabreicht. Die Kontrollen wurden nicht behandelt. Nach der Zwangsfütterung hatten die Tiere freien Zugang zu Futter bis zum darauf folgenden Morgen. Am Morgen des 6. Tages wurden die Tiere mit einer Überdosis Narcoren getötet, und die Lebern sofort mit NaCl-Lösung blutleer gespült, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -70° gelagert.

3.26.3 Der Einfluss von Olivenöl und Fischöl auf die CAR-Expression *in vivo*

30 mg Rattenleber wurden in flüssigem Stickstoff zermörsert und in 175 μ L RNA-Lysis-Puffer lysiert. Die mRNA wurde isoliert (3.9), in cDNA umgeschrieben und in die RT-Q-PCR eingesetzt (3.10).

4 ERGEBNISSE

4.1 Die CAR-abhängige Cytochrom P450 2B-Expression *in vitro* als Modell der CAR / PPAR α Agonisten-Interaktion in Hepatozyten der Ratte

Da CYP2B1 als ein Model für die Interaktion von PPAR α mit CAR-abhängigen Signalwegen dienen sollte, mussten zunächst Kulturbedingungen gefunden werden, in denen die fremdstoffmetabolisierenden Eigenschaften der Hepatozyten erhalten bleiben und Cytochrom P450 2B1 exprimiert wird. Phenobarbital (PB) ist ein Induktor der CYP2B1-Expression. Zusätzlich induziert es auch andere Enzyme des Fremdstoffmetabolismus z.B. die Synthese der für CYP2B1 notwendigen prosthetische Gruppe durch ALAS-I (Kakizaki, *et al.* 2003). Schuetz, *et al.* fanden, dass die Beschichtung der Kulturschalen mit Collagen die CYP2B-Aktivität positiv beeinflusste (Schuetz, *et al.* 1988). Mit dem Ziel CYP2B optimal zu exprimieren, experimentierten Sinclair *et al.* unter anderem mit Williams E- und Weymouth Medium in verschiedener Zusammensetzung und entschieden sich dann für die Kultivierung in Williams E-Medium (Sinclair, *et al.* 1990). Wurde z.B. der Phosphatgehalt des Williams E-Mediums (1,4 mM) dem des Weymouth-Medium (6,5 mM) angeglichen, wurde die CYP2B-Aktivität schwächer durch PB induziert (Sinclair, *et al.* 1990). Sie beobachteten auch, dass Insulin und Dexamethason die CYP2B-Aktivität förderten. Der Zusatz einer Kombination aus Insulin, Transferrin und Natriumselenit (ITS) zum Kulturmedium wirkte sich ebenfalls positiv auf die CYP2B1-Expression aus (Jarukamjorn, *et al.* 1999, Sidhu und Omiecinski 1995).

4.1.1 Die Optimierung der Kulturbedingungen für die spezifische 7-Pentoxyresorufin-O-Depentylierungs-Aktivität des Cytochrome P450 2B

In Mikrosomen von Hepatozyten, die ohne PB kultiviert worden waren, konnte keine CYP2B-Aktivität detektiert werden (nicht gezeigt). Erst die Kultivierung der Hepatozyten für 48 h in Gegenwart von 1 mM PB ermöglichte die Messung der 7-Pentoxyresorufin-O-Depentylierungs-Aktivität des CYP2B in den Mikrosomen (Abb. 8). Die Zugabe einer Kombination aus Insulin, Transferrin und Natriumselenit (ITS) verstärkte die PB-induzierte CYP2B-Aktivität (Abb. 8). Collagenbeschichtung der Kulturschalen wirkte sich ebenfalls positiv auf die CYP2B-Aktivität aus, auch wenn nicht durchweg eine Signifikanz festgestellt werden konnte (Abb. 8). Bei der Gegenüberstellung von Williams E-Medium und Medium 199 wurde deutlich, dass die CYP2B-Aktivität in, in Williams E-Medium kultivierten, Hepatozyten besser induziert wurde. In den Hepatozyten, die auf collagenierten Platten in Williams E ausgesät und zusätzlich ab dem ersten Mediumwechsel (nach 4 h) mit ITS und ab dem zweiten

Mediumwechsel (nach 24 h) mit 1 mM PB behandelt wurden, wurde die CYP2B-Aktivität am stärksten induziert (Abb. 8). Das mikroskopische Erscheinungsbild der Hepatozyten lässt darauf schließen, dass die Collagenbeschichtung zusammen mit der Zusammensetzung des Mediums und den Zusätzen wie Insulin, möglicherweise über die Verbesserung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte, die Zellviabilität förderte.

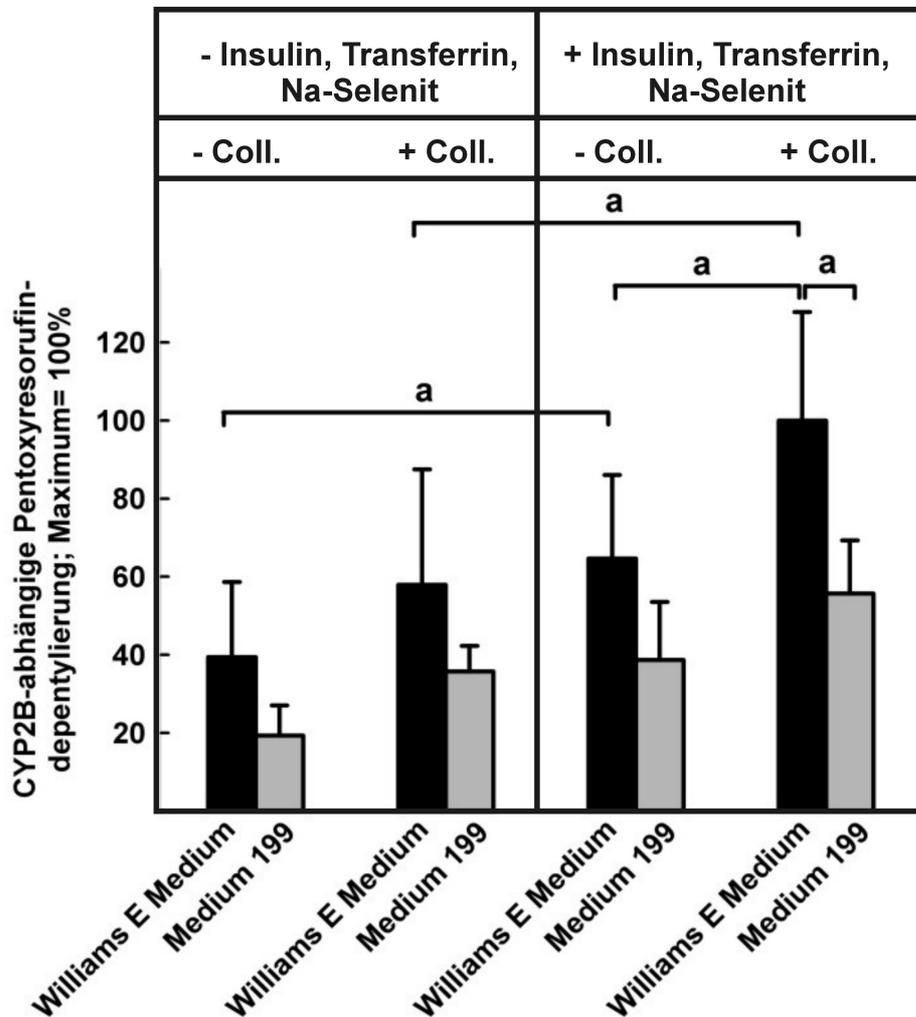


Abb. 8: Die 7-Pentoxyresorufin-O-Depentylierungs-Aktivität des CYP2B unter verschiedenen Kulturbedingungen.

Hepatozyten der Ratte wurden isoliert (3.1) und auf collagenierten oder nicht-collagenierten Kulturplatten ausgesät. Wenn angegeben erfolgte die Zugabe von ITS 4 h nach dem Ausplattieren. Nach 24 h Kultur wurden die Hepatozyten für weitere 48 h mit PB oder ohne PB kultiviert. Als Medium wurde entweder Williams E oder M199 verwendet. Nach 72 wurde der Versuch beendet (3.2.4). Mikrosomen wurden durch Zentrifugation präpariert (3.4). Die spezifisch durch CYP2B1-katalysierte O-Depentylierung von 7-Pentoxyresorufin zu Resorufin wurde fluorometrisch aufgenommen (3.6). Die Aktivität wurde in pmol Resorufin/ min*mg Gesamtprotein berechnet und dann in Prozent des Maximalwertes angegeben (100 %= 13,1 +/- 3,6 pmol/ min*mg). Gezeigt sind die Daten der Inkubationen mit 1 mM PB. Angegeben wurden die Mittelwerte ± S.E.M. aus drei unabhängigen Experimenten. a: signifikant unterschiedlich (p< 0,05), t-test für gepaarte Stichproben.

Nachdem die Kulturbedingungen, unter denen CYP2B in Hepatozyten induziert werden kann, erfolgreich optimiert worden waren, wurden zwei strukturell unterschiedliche PPAR α -Agonisten, WY 14643 und GW 7647, ausgewählt, mit deren Hilfe die PPAR α -Agonisten abhängige Expression und Aktivität des CAR-Zielgens CYP2B1, mit und ohne Behandlung mit PB, untersucht werden sollte (3.2.4).

4.1.2 Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die mRNA Expression des PPAR α -Zielgens Acyl CoA Oxidase 1

In humanen Zellen beträgt die EC₅₀ der PPAR α -Aktivierung durch WY 14643 und GW 7647 laut Hersteller 630 nM bzw. 6 nM. Für die Behandlung der Hepatozyten der Ratte mit PPAR α -Agonisten wurde die Konzentration von WY 14643 auf 10 μ M und die von GW 7647 auf 1 μ M festgelegt. Zunächst wurde die Funktionalität der beiden PPAR α -Agonisten unter Standardbedingungen überprüft (3.2.4), das heißt kultivierte Hepatozyten wurden nach dem Mediumwechsel nach 48 h für 24 h mit GW 7647 (1 μ M), WY 14643 (10 μ M) bzw. DMSO inkubiert. Daraufhin wurden Northern Blots (3.11) mit einer für das PPAR α -Zielgen Acyl-CoA-Oxidase-I (ACO-I) der Ratte spezifischen Oligonucleotidprobe hybridisiert. Kontroll-Hybridisierungen wurden mit einer Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Oligonucleotidprobe durchgeführt (Hirsch-Ernst, *et al.* 2001). In DMSO-behandelten Kontroll-Hepatozyten wurde kaum ACO-I-mRNA exprimiert (Abb. 9). Auch PB beeinflusste die ACO-I-mRNA Expression nicht. WY 14643 (10 μ M) induzierte die ACO-I-mRNA 4,5-fach stärker als GW 7647 (1 μ M) (Abb. 9).

4.1.3 Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf CYP2B-Expression

Um den Einfluss der beiden PPAR α -Agonisten auf die CYP2B1-mRNA-Expression zu untersuchen, wurden die oben beschriebenen Hybond-N Nylonmembranen gewaschen, mit einer mit ³²[P]ATP markierten für das Cytochrome P450 2B1 Gen der Ratte (5'-GGTTGGTAGCCGGTGTGA-3') spezifischen Oligonucleotidprobe hybridisiert und mit den oben beschriebenen GAPDH-Kontrollhybridisierungen verglichen (3.11). In nicht-PB-behandelten Hepatozyten war die CYP2B1-mRNA praktisch nicht nachweisbar, unabhängig davon, ob die Hepatozyten mit DMSO, GW 7647 oder WY 14643 behandelt wurden (Abb. 10). In PB-behandelten Hepatozyten wurde CYP2B1-mRNA exprimiert. Das Verhältnis der CYP2B1-mRNA-Bandenintensität zu der GAPDH-mRNA-Bandenintensität unter diesen Bedingungen wurde 100 % gesetzt (Abb. 10). Bei zusätzlicher Behandlung mit GW 7647 (1 μ M) oder WY 14643 (10 μ M) wurde die CYP2B1-mRNA-Expression 1,5-fach bzw. 2-fach stärker induziert (Abb. 10). Beide PPAR α -Agonisten verstärkten die PB-abhängige Induktion der CYP2B1-mRNA-Expression. Von Hepatozyten des gleichen Versuchs (3.2.4) wurden

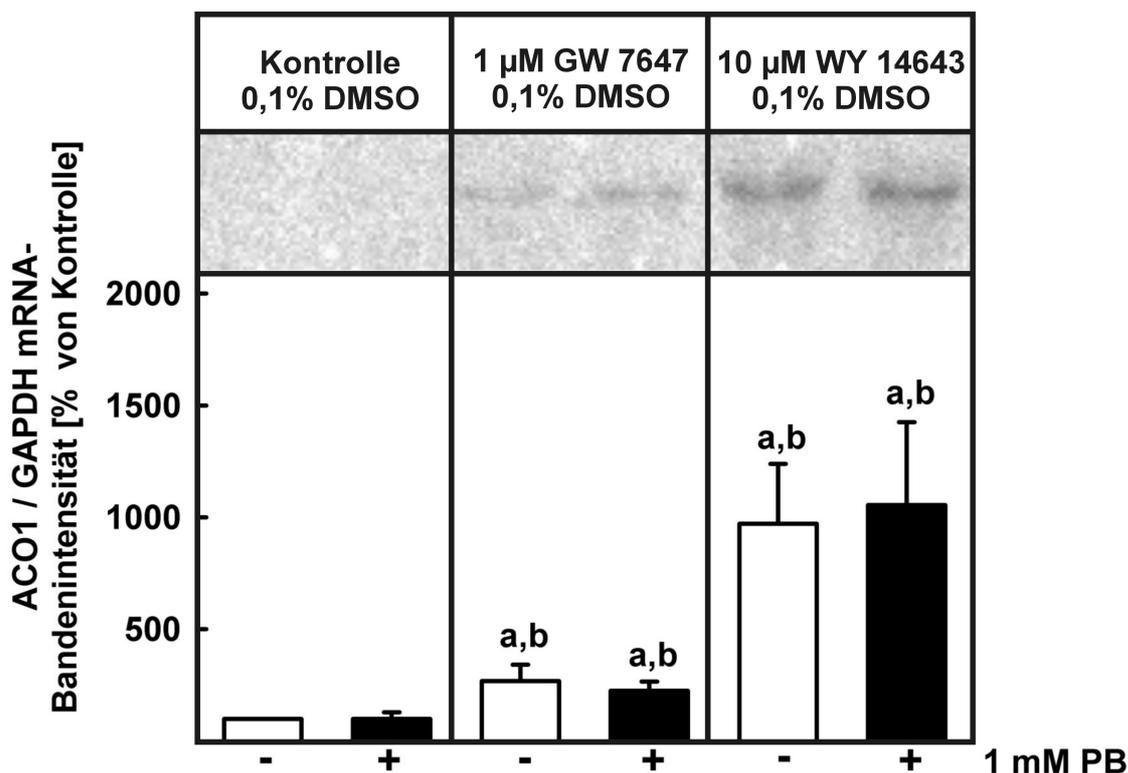


Abb. 9: Der Einfluss von PPARα-Agonisten auf die ACO I mRNA-Expression.

Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter 3.1 beschrieben, isoliert. Für 24 h in Williams E Kulturmedium (komplett) kultivierte Hepatozyten wurden, wie angegeben zum Teil, mit 1 mM PB behandelt. Nach weiteren 24 h wurden sie zusätzlich mit den PPARα-Agonisten GW 7647 (1 µM) bzw. WY 14643 (10 µM) oder DMSO behandelt. Der Versuch wurde nach 72 h beendet (3.2.4). RNA wurde nach der Methode von CHOMCZYNSKI and SACCHI isoliert, elektrophoretisch in einem Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Hybond-N Nylonmembran transferiert. Die Northern Blots wurden mit einer mit ³²[P]ATP markierten, für das Acyl CoA Oxidase 1 Gen der Ratte (5'-AGGCTGTGAGGATCAGAGTTC-3') spezifischen Oligonucleotidprobe hybridisiert. Die RNA-Expression wurde mittels eines Imaging Systems (Fujix BAS 1500 Bio-Imaging Analyzer, Fujix, Tokio, Japan) quantifiziert. Kontroll-Hybridisierungen wurden mit einer GAPDH Oligonucleotidprobe (Hirsch-Ernst, *et al.* 2001) durchgeführt (3.11). Dargestellt ist jeweils das Verhältnis der ACO1-mRNA-Bandenintensität zu der GAPDH-Bandenintensität als % von der Kontrolle. a = signifikant unterschiedlich von Kontrolle (p< 0,05), b = signifikant unterschiedlich von Kontrolle + PB (p< 0,05), t-test für gepaarte Stichproben.

Mikrosomen präpariert (3.4). 50 µg Protein der Mikrosomenpräparation wurden im Westernblot mit einem monoklonalen Maus IgG Antikörper gegen Ratten-CYP2B sowie einem Peroxidasegekoppeltem Sekundäntikörper inkubiert und CYP2B-Protein mit dem ECL-System detektiert (3.7). In nicht-PB-behandelten Hepatozyten konnte keine CYP2B-Protein-Expression detektiert werden (Abb. 11). In PB-behandelten Hepatozyten wurde CYP2B-Protein exprimiert. Das Verhältnis der einzelnen absoluten CYP2B-Protein-Bandenintensität zur gesamten absoluten CYP2B-Bandenintensität unter diesen Bedingungen wurde bestimmt und 100 % gesetzt (Abb. 11). Zusätzliche Behandlung mit GW 7647 (1 µM) oder WY 14643

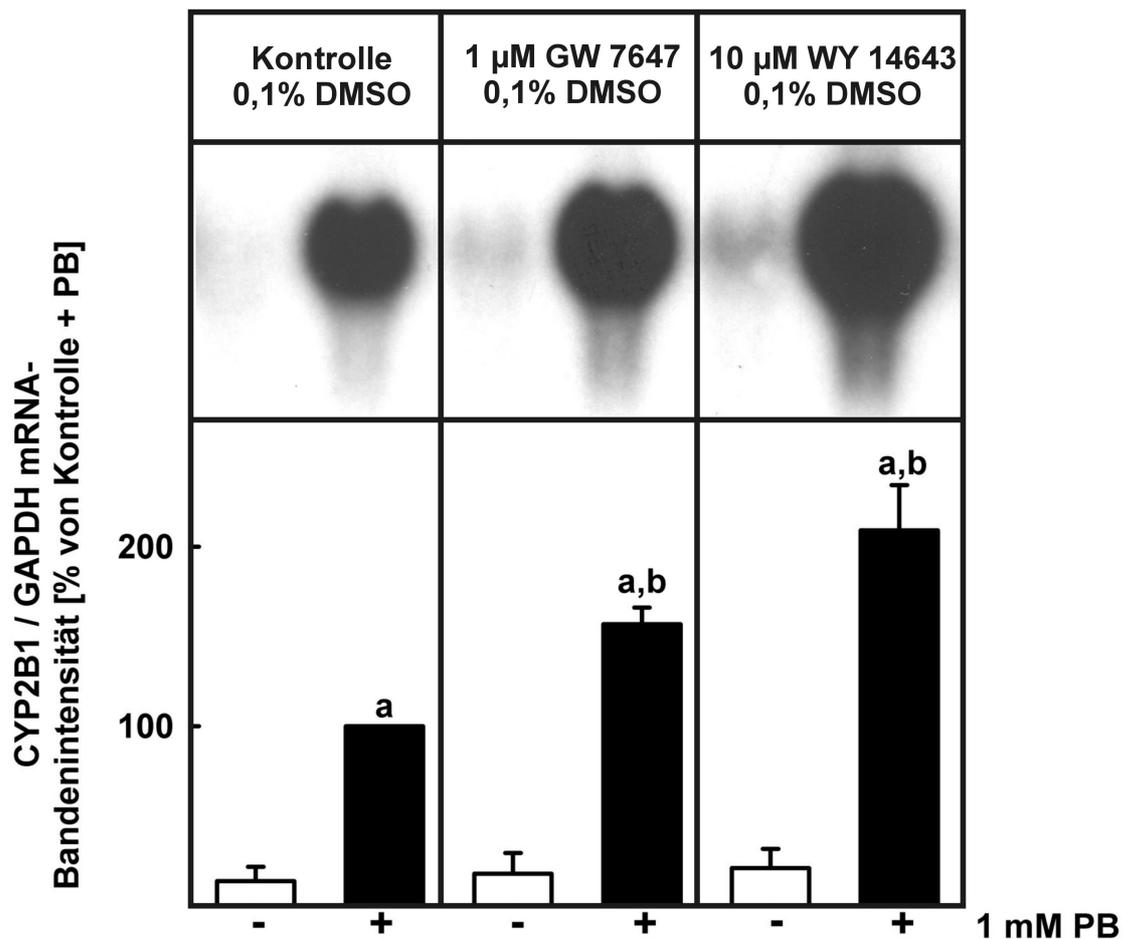


Abb. 10: Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CYP2B1 mRNA-Expression.

Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter 3.1 beschrieben, isoliert, wie in Abb. 9 beschrieben, behandelt und aufgearbeitet. Die Northern Blots wurden mit einer mit ^{32}P ATP markierten, für das Cytochrome P450 2B1 Gen der Ratte (5'-GGTTGGTAGCCGGTGTGA-3') spezifischen Oligonucleotidprobe hybridisiert. Der RNA Spiegel wurde mittels eines Imaging Systems (Fujix BAS 1500 Bio-Imaging Analyzer, Fujix, Tokio, Japan) quantifiziert. Kontroll-Hybridisierungen wurden mit einer GAPDH Oligonucleotidprobe (Hirsch-Ernst, *et al.* 2001) durchgeführt (3.11). Dargestellt ist jeweils das Verhältnis der CYP2B1-mRNA-Bandenintensität zu der GAPDH-Bandenintensität als % von der Kontrolle + PB. a = signifikant größer als Kontrolle ($p < 0,05$), b = signifikant größer als Kontrolle + PB ($p < 0,05$), t-test für gepaarte Stichproben.

(10 μM) verstärkte auch die PB-abhängige CYP2B-Protein-Expression 2,5-fach bzw. 3-fach (Abb. 11).

4.1.4 Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf CYP2B-Aktivität

Die zur Bestimmung der CYP2B-Protein-Expression präparierten Mikrosomen wurden auch für die Messung der enzymatischen CYP2B-Aktivität, mittels der CYP2B-spezifischen Pentoxyresorufindepentylisierung verwendet (3.6). Die Resorufinfreisetzung über die Zeit wurde fluorometrisch detektiert und gab Aufschluss über die katalytische Aktivität der CYP2B-

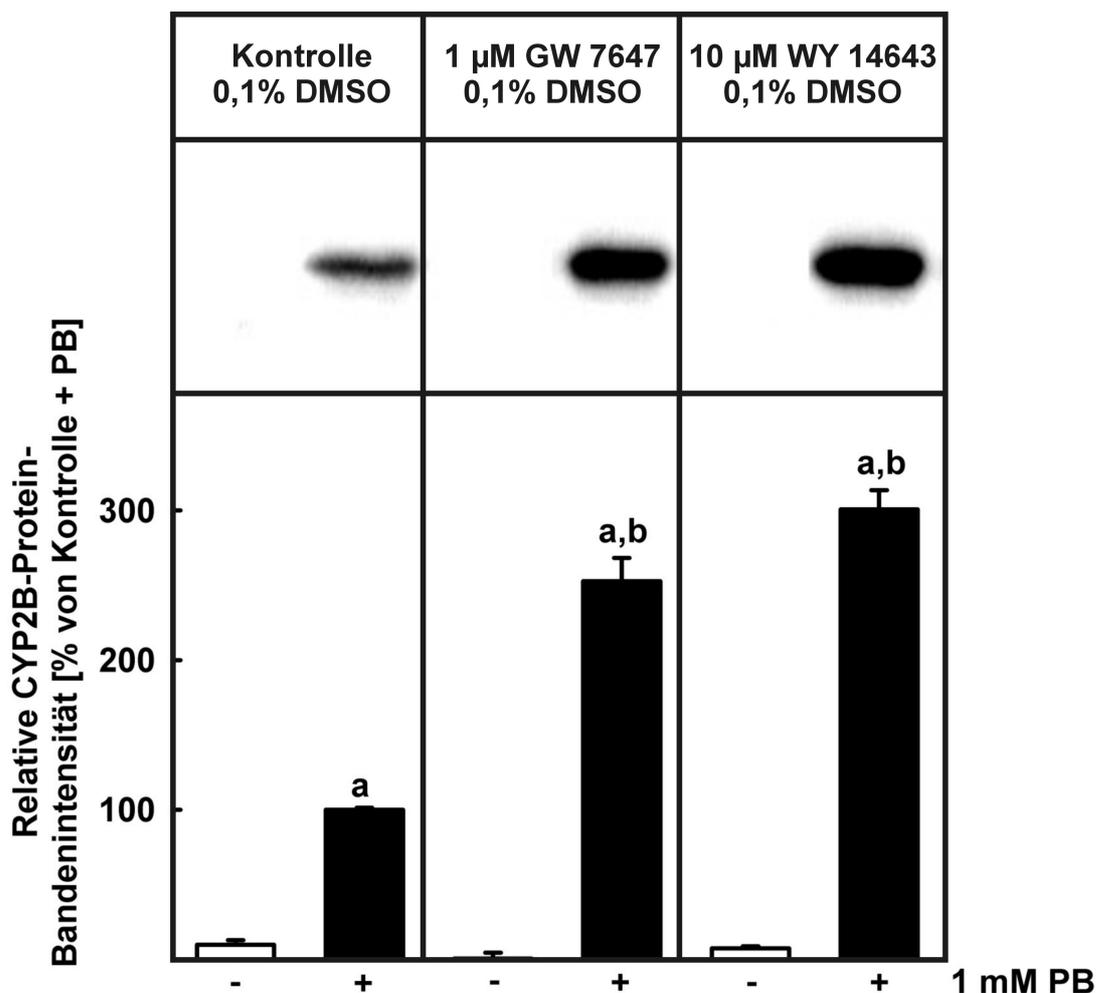


Abb. 11: Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CYP2B1-Protein-Expression.

Hepatozyten der Ratte wurden, wie in Abb. 9 beschrieben, kultiviert, Mikrosomen präpariert und der Gesamtproteingehalt nach der LOWRY-Methode bestimmt (3.4). 50 μ g Protein wurden im Westernblot mithilfe eines monoklonalem Maus IgG Antikörper gegen Ratten-CYP2B, einem Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper und dem ECL-System detektiert (3.7). Die spezifischen Banden wurden mit dem Software Programm Quantity One der Firma Biorad quantifiziert. Bestimmt wurde das Verhältnis der einzelnen absoluten CYP2B-Protein-Bandenintensität zur gesamten absoluten CYP2B-Bandenintensität. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei unabhängigen Experimenten angegeben in % von Kontrolle + PB. Ein repräsentativer Blot ist gezeigt. a = signifikant größer als Kontrolle ($p < 0,05$), b = signifikant größer als Kontrolle + PB ($p < 0,05$), t-test für gepaarte Stichproben.

Proteine. Unabhängig von der Behandlung mit PPAR α -Agonisten konnte in nicht-PB-behandelten Hepatozyten keine CYP2B-Aktivität gemessen werden (Abb. 12). In PB-behandelten Hepatozyten wurden durch CYP2B-Enzyme im Mittel 21,10 (\pm 6) pmol Resorufin/ mg Protein* min umgesetzt (Abb. 12). Zusätzliche Behandlung mit GW 7647 (1 μ M) bzw. WY 14643 (10 μ M) verdoppelte die PB-abhängige CYP2B-Aktivität auf 44,97 (\pm 11) pmol Resorufin/ mg Protein* min, bzw. 42,76 (\pm 12) pmol Resorufin/ mg Protein* min (Abb. 12).

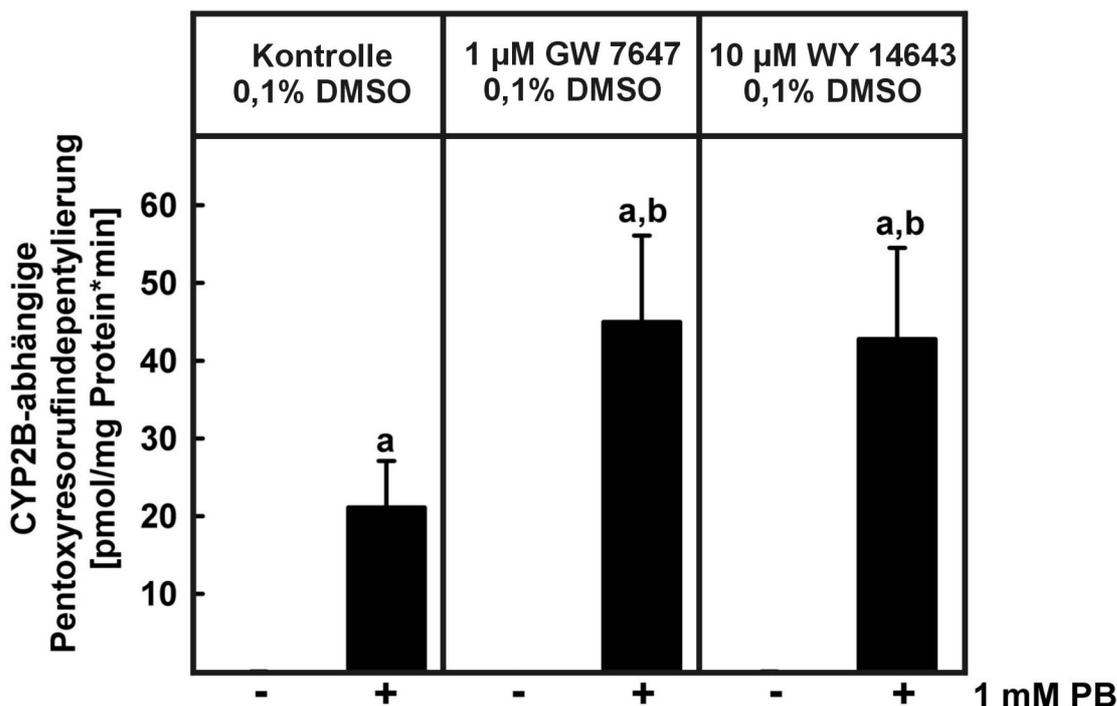


Abb. 12: Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CYP2B-Aktivität.

Ratten-Hepatozyten wurden, wie in Abb. 9 beschrieben, behandelt, Mikrosomen präpariert (3.4) und die spezifisch durch CYP2B-katalysierte O-Depentylierung von 7-Pentoxoresorufin zu Resorufin fluorimetrisch aufgenommen (3.6). Die Aktivität wurde in pmol Resorufin/min*mg Gesamtprotein berechnet. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten. a = signifikant unterschiedlich von Kontrolle ($p < 0,05$), b = signifikant unterschiedlich von Kontrolle + PB ($p < 0,05$), t-test für gepaarte Stichproben.

Im nächsten Experiment wurden die Hepatozyten wiederum für 72 h kultiviert und dann Mikrosomen präpariert. Alle kultivierte Hepatozyten (3.2.4.) wurden bis auf eine Kontrolle (Williams E-Kulturmedium + ITS) nach 24 h für die letzten 48 h in Williams E-Kulturmedium + ITS + PB (1 mM) weiterkultiviert. Die Hepatozytenkulturen wurden für die letzten 48, 30, 24, 18, 12, 6 oder 2 h mit dem Lösungsmittel DMSO (0,1 %), 1 μ M GW 7647 oder 10 μ M WY 14643 inkubiert. Eine Kontrolle wurde gar nicht und eine weitere nur mit PB behandelt. In Mikrosomen aus Hepatozyten, die nicht mit 1 mM PB behandelt wurden, konnte keine CYP2B-Aktivität nachgewiesen werden (nicht gezeigt). PB-behandelte Hepatozyten wiesen im Mittel eine CYP2B-Aktivität von 29,64 (\pm 3,5) pmol Resorufin/ mgProtein* min auf, diese wurde mit einer Aktivität von 100 % gleichgesetzt (Abb. 13). Wurde den Hepatozyten zusätzlich zu dem PB zu den verschiedenen Zeitpunkten DMSO (0,1%) zugesetzt, war die CYP2B-Aktivität geringfügig niedriger als in nur PB-behandelten Hepatozyten (nicht signifikant verändert) (Abb. 13). In kultivierten Hepatozyten, die zusammen mit dem PB für die letzten 48 h bis 18 h mit den PPAR α -Agonisten behandelt wurden, stieg die PB-abhängige CYP2B-Aktivität auf etwa das 1,6-fache an (Abb. 13). Es konnte hingegen kein Unterschied zu der PB-abhängigen CYP2B- Aktivität der Kontrollen (0,1 % DMSO) festgestellt werden (Abb. 13), wenn die Hepatozyten die letzten 12 h oder weniger mit PPAR α -Agonisten inkubiert wurden. In PB-

behandelten Hepatozyten, die für die letzten 24 h mit den PPAR α -Agonisten behandelt wurden, stieg die PB-abhängige CYP2B-Aktivität bereits maximal an (Abb. 13).

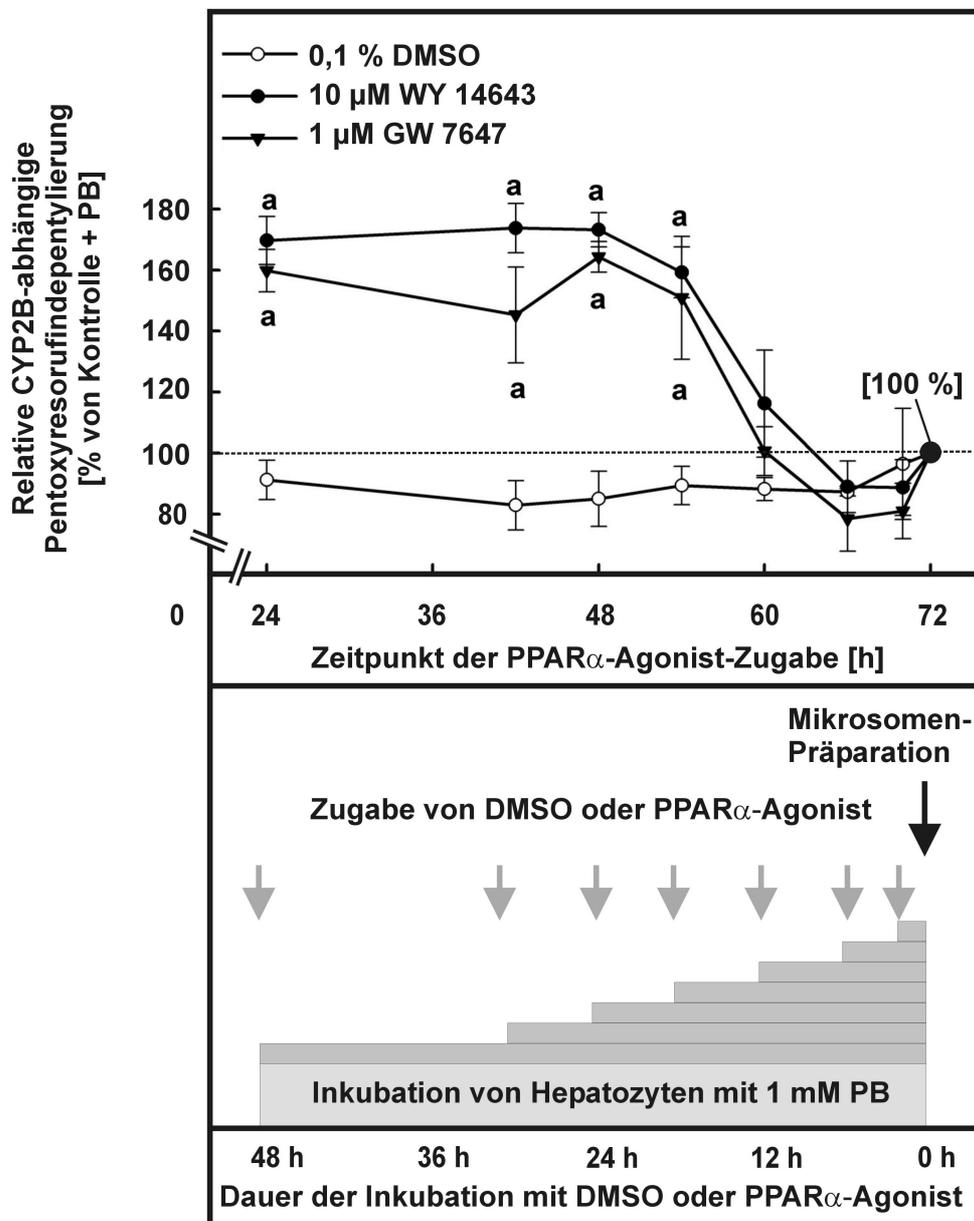


Abb. 13: Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CYP2B-Aktivität unter Berücksichtigung der Behandlungsdauer

Für 24 h kultivierte Hepatozyten der Ratte (3.2.4) wurden mit 1 mM PB und zusätzlich zu den Zeitpunkten 24, 42, 48, 54, 60, 66 oder 70 h, das heißt für die letzten 48, 30, 24, 18, 12, 6 oder 2 h in Kultur, mit den PPAR α -Agonisten GW 7647 (1 μ M) bzw. WY 14643 (10 μ M) oder DMSO behandelt. Mikrosomen wurden durch Zentrifugation präpariert (3.4) und die spezifisch durch CYP2B-katalysierte O-Depentylierung von 7-Pentoxoresorufin zu Resorufin fluorometrisch aufgenommen. Die Aktivität wurde in pmol Resorufin/ mg Protein* min berechnet und dann als % von der Kontrolle+ PB dargestellt. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten. a = signifikant unterschiedlich von entsprechender Kontrolle (DMSO 0,1 %) ($p < 0,05$); t-test für gepaarte Stichproben.

Kultivierte Hepatozyten (3.2.4). wurden, wie angegeben, nach 24 h zum Teil mit 1 mM PB und nach 48 h zusätzlich mit aufsteigenden Dosen von 0,0001 μM bis 10 μM des jeweiligen PPAR α -Agonisten bzw. DMSO (0,1 %, Kontrolle) behandelt. Nach 72 h wurden Mikrosomen präpariert. Unabhängig von der PPAR α -Agonist-Dosis wurde in Mikrosomen nicht-PB-behandelter Hepatozyten keine CYP2B-Aktivität detektiert (Abb. 14). In Mikrosomen von PB-behandelten Hepatozyten wurde eine CYP2B-Aktivität von 71,07 (+/- 18,4) pmol Resorufin/mgProtein* min gemessen und 100 % gleichgesetzt (Abb. 14). Beide PPAR α -Agonisten steigerten die PB-abhängige CYP2B-Aktivität dosisabhängig auf maximal das 2,5-fache (Abb. 14). Der EC₅₀ betrug für beide PPAR α -Agonisten ungefähr 0,01 μM (Abb. 14). Die im Standardexperiment (3.2.4) verwendeten Konzentrationen von sowohl 1 μM GW 7647, als auch WY 14643 (10 μM) lagen im Sättigungsbereich der durch die PPAR α -Agonisten vermittelten Steigerung der PB-abhängigen CYP2B-Aktivität.

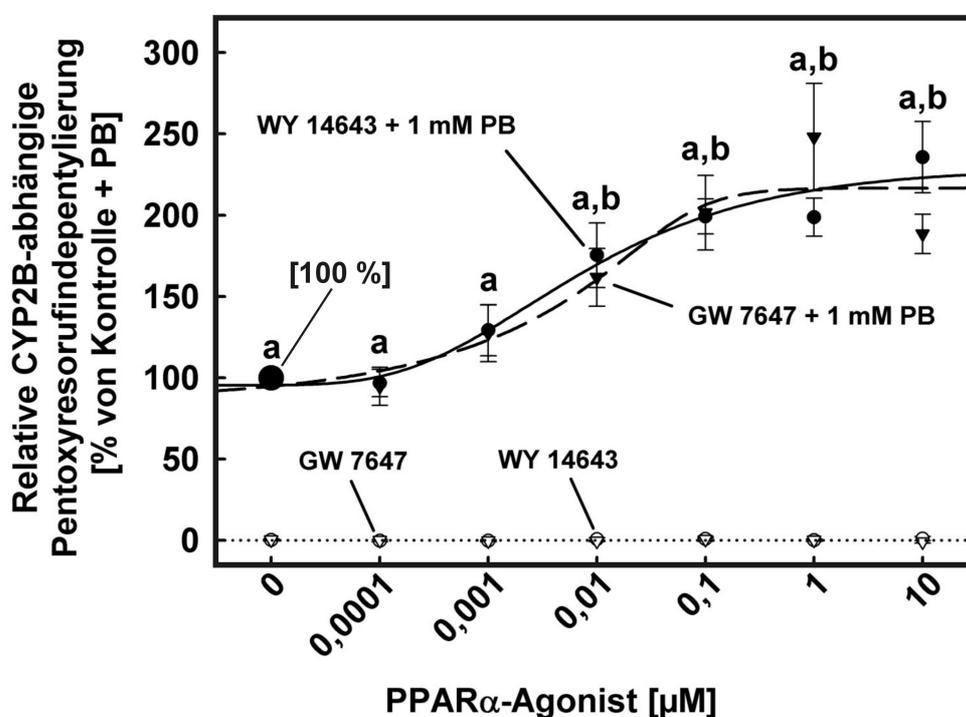


Abb. 14: Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CYP2B-Aktivität in Abhängigkeit von der Dosis.

Kultivierte Hepatozyten der Ratte (3.2.4) wurden nach 24 h, wie angegeben, zum Teil mit 1 mM PB behandelt. Nach 48 h wurden sie zusätzlich mit den PPAR α -Agonisten GW 7647 bzw. WY 14643 (0 (Kontrolle, DMSO 0,1 %), 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1 oder 10 μM) behandelt. Mikrosomen wurden präpariert (3.4) und die spezifisch durch CYP2B-katalysierte O-Depentylisierung von 7-Pentoxoresorufin zu Resorufin fluorometrisch aufgenommen (3.6). Die Aktivität wurde in pmol Resorufin/ min*mg Protein berechnet und dann in % von der Kontrolle + PB (DMSO 0,1 %, PB 1 mM) gegen die Konzentration aufgetragen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten. a = signifikant unterschiedlich von Kontrolle ($p < 0,05$), b = signifikant unterschiedlich von Kontrolle + PB ($p < 0,05$), t-test für gepaarte Stichproben.

Zur Erstellung von PB-Dosis-Wirkungskurve wurden kultivierte Hepatozyten (3.2.4) nach 24 h ohne bzw. mit 0,001 mM, 0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM, oder 2 mM PB und nach 48 h zusätzlich mit GW 7647 (1 μ M), WY 14643 (10 μ M) oder DMSO (0,1 %) behandelt. Nach 72 h wurden Mikrosomen präpariert. In mit 1 mM PB-behandelten Hepatozyten (Kontrolle, 0,1% DMSO) wurde eine CYP2B-Aktivität von 34,68 (\pm 8,5) pmol Resorufin/ mg Protein* min detektiert und 100 % gleichgesetzt (Abb. 15). Ab einer Dosis von 0,01 mM bis 1 mM PB wurde in den Hepatozyten die CYP2B-Aktivität signifikant dosisabhängig induziert (Abb. 15). Nach Behandlung mit 2 mM PB sank die CYP2B-Aktivität jedoch wieder um mehr als die Hälfte ab (Abb. 15). Beide PPAR α -Agonisten verdoppelten die PB-abhängige Induktion der CYP2B-Aktivität (Abb. 15) unabhängig von der PB-Konzentration. Bei mikroskopischer Betrachtung der mit 2 mM PB-behandelten Hepatozyten fielen vermehrt Zelltrümmer in den Kulturschalen auf. Nach Behandlung mit 10 mM PB lösten sich über Nacht die Hepatozyten fast vollständig vom Boden der Kulturschalen und starben ab (nicht gezeigt). In die Berechnung

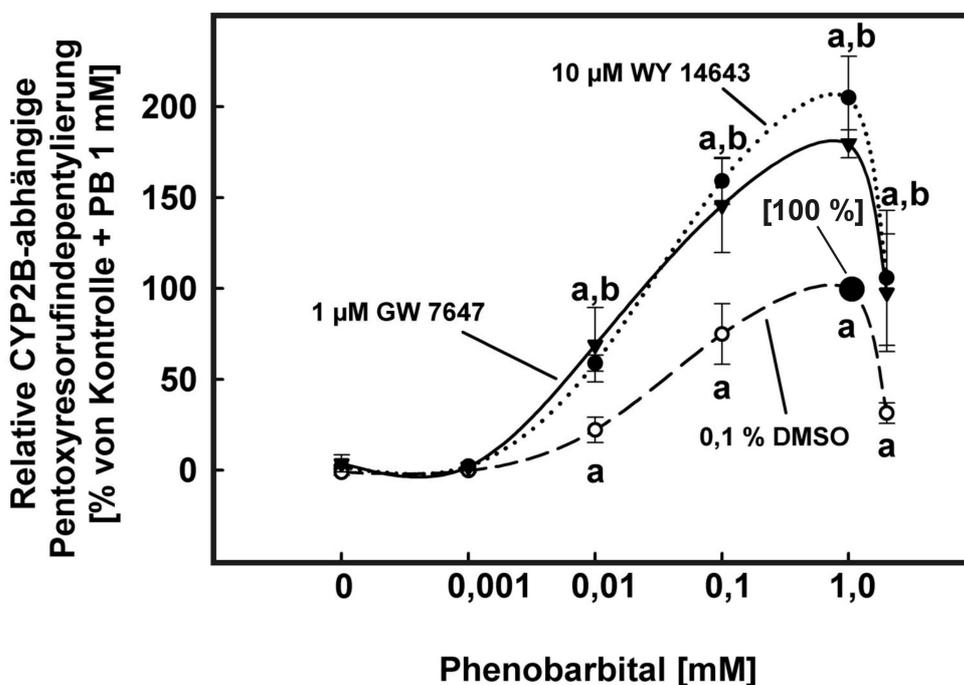


Abb. 15: Der Einfluss der Phenobarbitaldosis auf die PPAR α -Agonisten-vermittelte CYP2B-Aktivität.

Kultivierte Hepatozyten der Ratte (3.2.4) wurden nach 24 h mit PB (0; 0,001; 0,01; 0,1; 1 oder 2 mM) und nach 48 h zusätzlich mit den PPAR α -Agonisten GW 7647 (1 μ M) bzw. WY 14643 (10 μ M) oder DMSO (0,1 %) behandelt. Mikrosomen wurden präpariert (3.4) und die spezifisch durch CYP2B-katalysierte O-Depentylierung von 7-Pentoxoresorufin zu Resorufin fluorometrisch aufgenommen (3.6). Die Aktivität wurde in pmol Resorufin/ min*mg Gesamtprotein berechnet und dann in % der Kontrolle + PB (1 mM) gegen die Konzentration aufgetragen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten. a = signifikant unterschiedlich von Kontrolle (PB 0 mM) ($p < 0,05$), b = signifikant unterschiedlich von entsprechender Kontrolle + PB ($p < 0,05$); t-test für gepaarte Stichproben.

(nicht-lineare Regression) von v_{\max} und der EC_{50} von PB wurden die Konzentrationen von 0 bis 1 mM PB einbezogen. Bei den Kontrollen (0,1 % DMSO) betrug $v_{\max} = 100 \%$, die EC_{50} lag bei 0,04 mM PB, in WY 14643 bzw. GW 7647-behandelten Hepatozyten betrug $v_{\max} = 211 \%$ bzw. 181 % und die $EC_{50} = 0,03$ bzw. 0,02 mM PB (Abb. 15). Beide PPAR α -Agonisten führten tendentiell zu einer leichten Linksverschiebung der PB-Dosis-Wirkungskurve, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant.

4.1.5 Der Einfluss einer hohen Insulinkonzentration auf die CYP2B-Aktivität

Die Hepatozyten wurden zur optimalen CYP2B1-Expression mit einem ITS-Medium kultiviert, welches neben Natriumselenit und Transferrin mit 870 nM eine unphysiologisch hohe Insulinkonzentration enthielt. Um zu überprüfen, ob die PPAR α -vermittelte Steigerung der PB-abhängigen CYP2B-Aktivität Insulin-abhängig ist, wurde das in Abb. 12 gezeigte Experiment (3.2.4) gleichzeitig in Kulturmedium + 0,5 nM oder 870 nM Insulin und Medium + ITS (Standard) wiederholt. In Mikrosomen aus nicht-PB-behandelten Hepatozyten wurde keine CYP2B-Aktivität detektiert (nicht dargestellt). In Kulturmedium + 0,5 nM Insulin wurden PB-abhängig durch CYP2B 10 pmol Resorufin/ mg Protein* min, in Medium + 0,87 μ M Insulin 14 pmol Resorufin/ mg Protein* min und in Medium+ ITS (Standard) 18 pmol Resorufin/ mg Protein* min umgesetzt (Abb. 16A). Diese wurden im zweiten Teil der Abbildung zur besseren Darstellung jeweils 100 % gleichgesetzt (Abb. 16B). Abhängig vom Kulturmedium steigerte sich die PB-abhängige Induktion der CYP2B-Aktivität der Hepatozyten tendentiell wie folgt: 0,5 nM Insulin < 870 nM Insulin < ITS (Abb. 16A). Periportale Hepatozyten sind einer niedrigeren Insulinkonzentration ausgesetzt als perivenöse. Da CYP2B verstärkt in perivenösen Hepatozyten vorkommt, ist es möglich, dass die höhere Insulinkonzentration die CYP2B-Expression positiv beeinflusste (Kietzmann, *et al.* 1999, Oinonen und Lindros 1998). Beide PPAR α -Agonisten steigerten diese PB-abhängige Induktion der CYP2B-Aktivität unabhängig vom Kulturmedium auf das 4- bis 5-fache (Abb. 16B). Unter dem Mikroskop konnte beobachtet werden, dass sich die Hepatozyten in Medium mit hoher Insulinkonzentration wesentlich besser auf den Kulturschalen anhefteten bzw. hafteten. Daher lagen die fluorometrisch gemessenen Absolutwerte (RFU) der Versuchsreihe mit 0,5 nM Insulin erheblich unter denen der Versuchsreihen mit 0,87 μ M Insulin, was die Messung erschwerte (nicht gezeigt).

4.2 Molekulare Mechanismen der PPAR α -Agonisten-vermittelten Steigerung der Phenobarbital-abhängigen CYP2B1 Expression

PB aktiviert die Translokation des Transkriptionsfaktors CAR aus dem Cytosol in den Zellkern. Dort bindet CAR als Heterodimer mit RXR α an ein PBREM im Promotorbereich des CYP2B1-

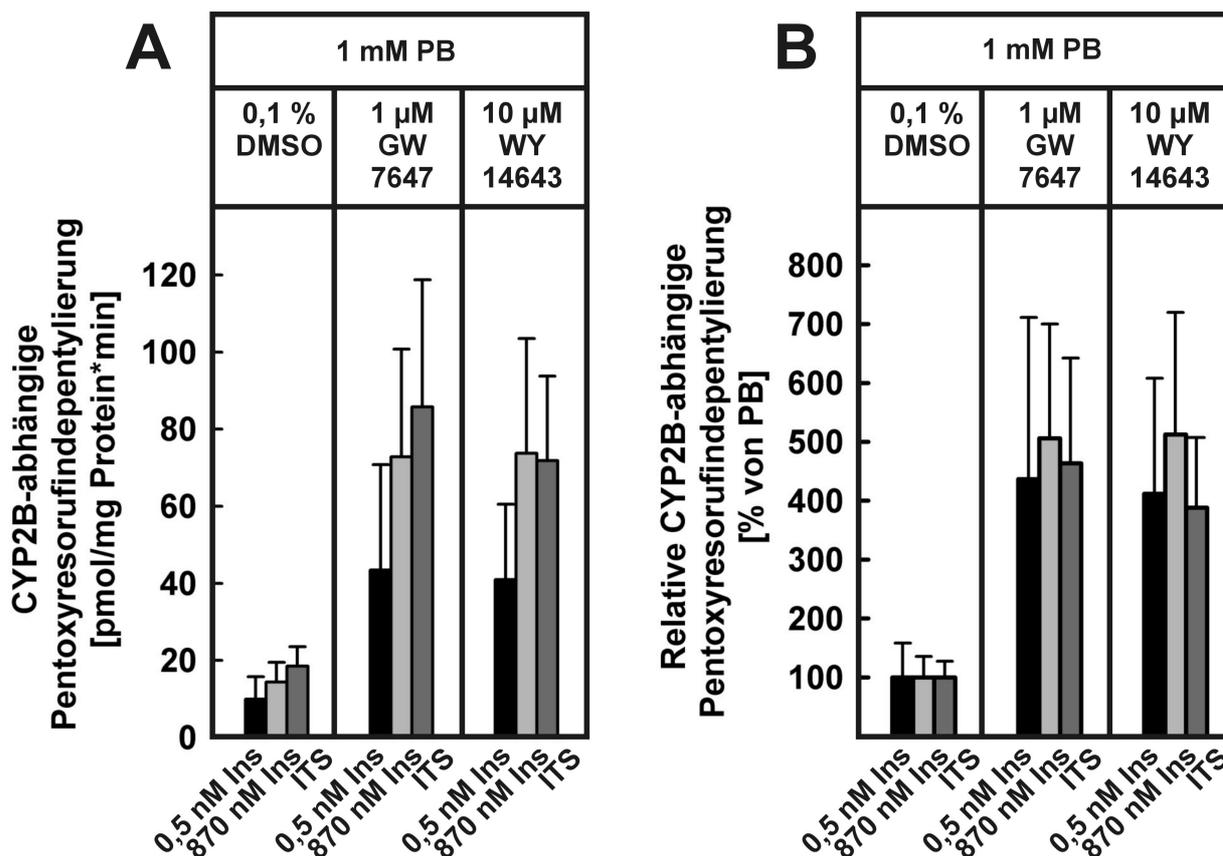


Abb. 16: Der Einfluss einer hohen Insulinkonzentration auf die PPAR α -Agonisten-vermittelte Steigerung der PB-abhängigen CYP2B-Aktivität.

Hepatozyten der Ratte (3.2.4) wurden in Medium mit 0,5 nM, 870 nM Insulin oder ITS kultiviert, nach 24 h, wie angegeben, zum Teil mit PB (1mM) und nach 48 h zusätzlich mit den PPAR α -Agonisten GW 7647 (1 μ M) bzw. WY 14643 (10 μ M) oder DMSO (0,1 %) behandelt. Mikrosomen wurden präpariert (3.4) und die spezifisch durch CYP2B-katalysierte O-Depentylisierung von 7-Pentoxyresorufin zu Resorufin fluorometrisch aufgenommen (3.6). Die Aktivität wurde in pmol Resorufin/ min*mg Protein berechnet. Dargestellt ist nur die PB-abhängige Induktion der CYP2B-Aktivität in: **A** pmol Resorufin/ mg Protein* min, **B** % des Mittelwertes der jeweiligen Kontrollen + PB (0,1 % DMSO, 1mM PB). Angegeben wurden die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Gens, rekrutiert Co-Faktoren und den Polymerase II-Komplex und initiiert somit die CYP2B1-Transkription. Um abzuklären, ob PPAR α -Agonisten, CAR- und damit PBREM-abhängig, die CYP2B1-Transkription steigern oder sie andere Promotorbereiche aktivieren, wurden 2,56 kb des Ratten-CYP2B1-Promotors in einen Luciferase-Reporter-gen-Vektor ligiert (D. Bauer, *et al.* 2004) und die Aktivität des Reporter gens, die sich proportional zur Promotoraktivierung verhält, detektiert.

4.2.1 Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CYP2B1-Transkription

Neben dem CYP2B1-Wildtyppromotor (pGL3C2B1) wurden CYP2B1-Promotordeletionskonstrukte benutzt, bei denen sukzessive ein Teil des Promotors entfernt worden war (D. Bauer, *et al.* 2004) (interne Deletionskonstrukte: pGL3CD2 (-353 bis -176 bp), pGL3CD3 (-701 bis -356 bp), pGL3CD4 (-1063 bis -700 bp), pGL3CD5 (-1451 bis -1075 bp), pGL3CD6 (-1807 bis -1453 bp), pGL3CD7 (-2156 bis -1808 bp) und pGL3CD8 (-2626 bis -2156 bp, kein PBREM)). Dabei kam dem Plasmid pGL3CD8 besondere Bedeutung zu, da in diesem Reporter-gen-Konstrukt das PBREM ausgeschaltet war. Kultivierte Hepatozyten (3.3.3) wurden mit den Reporter-gen-plasmiden transfiziert. Der weitere Versuch erfolgte unter Standardbedingungen, wie unter 3.2.4 erläutert. Die Aktivität des Wildtyppromotors wurde sowohl in PB- als auch PPAR α -Agonisten-behandelten Hepatozyten signifikant auf etwa 250 % induziert (Abb. 17). Gleichzeitige Behandlung der Hepatozyten mit PB und einem PPAR α -Agonisten führte zu einer signifikanten Steigerung der Luciferaseaktivität auf 932 % für GW 7647 und 778% für WY 14643 (Abb. 17). PPAR α -Agonisten steigerten folglich signifikant die PB-abhängige CYP2B1-Transkription. Die Auswertung der Versuche mit den Konstrukten pGL3CD3-CD7 ergab, dass diese sich nicht unterschiedlich zum Wildtyp verhielten. Die deletierten Bereiche des CYP2B1-Promotors spielten also weder für die PB-abhängige noch die PPAR α -Agonisten-vermittelte Steigerung der Reporter-genaktivität eine Rolle. Das Konstrukt pGL3CD8, in welchem das PBREM fehlte, reagierte wie erwartet nicht mehr auf PB (Abb. 17). Es konnte jedoch weiterhin durch beide PPAR α -Agonisten aktiviert werden (Abb. 17). Die im Wildtyp beobachtete Steigerung der PB-abhängigen Induktion der Transkription durch PPAR α -Agonisten blieb, aufgrund des fehlenden PBREM, aus. Der auch im Wildtyp beobachtete Eigeneffekt der PPAR α -Agonisten scheint unabhängig vom Vorhandensein des PBREMs zu sein (Abb. 17). Tatsächlich konnte bei dem Konstrukt pGL3CD2, welchem der proximale Bereich zwischen -353 bis -176 bp fehlte, zwar eine Induktion der Transkription durch PB auf 329 %, aber keine Induktion der Transkription durch die PPAR α -Agonisten alleine festgestellt werden (Abb. 17). Beide PPAR α -Agonisten waren dennoch in der Lage die PB-vermittelte Induktion der Reporter-genaktivität auf 676 % für GW 7647 bzw. 617 % WY 14643 zu steigern. (Abb. 17). Das zeigte, dass PPAR α -Agonisten offensichtlich über zwei verschiedene Wege auf den CYP2B1-Promotor einwirken, einen PB- und PBREM-abhängigen und einen PB- und PBREM-unabhängigen. Der PBREM- und damit CAR-abhängige Weg scheint der bedeutendere zu sein, da nur nach gleichzeitiger PB-Behandlung ein CYP2B1-RNA-Anstieg zu verzeichnen war (Abb. 10).

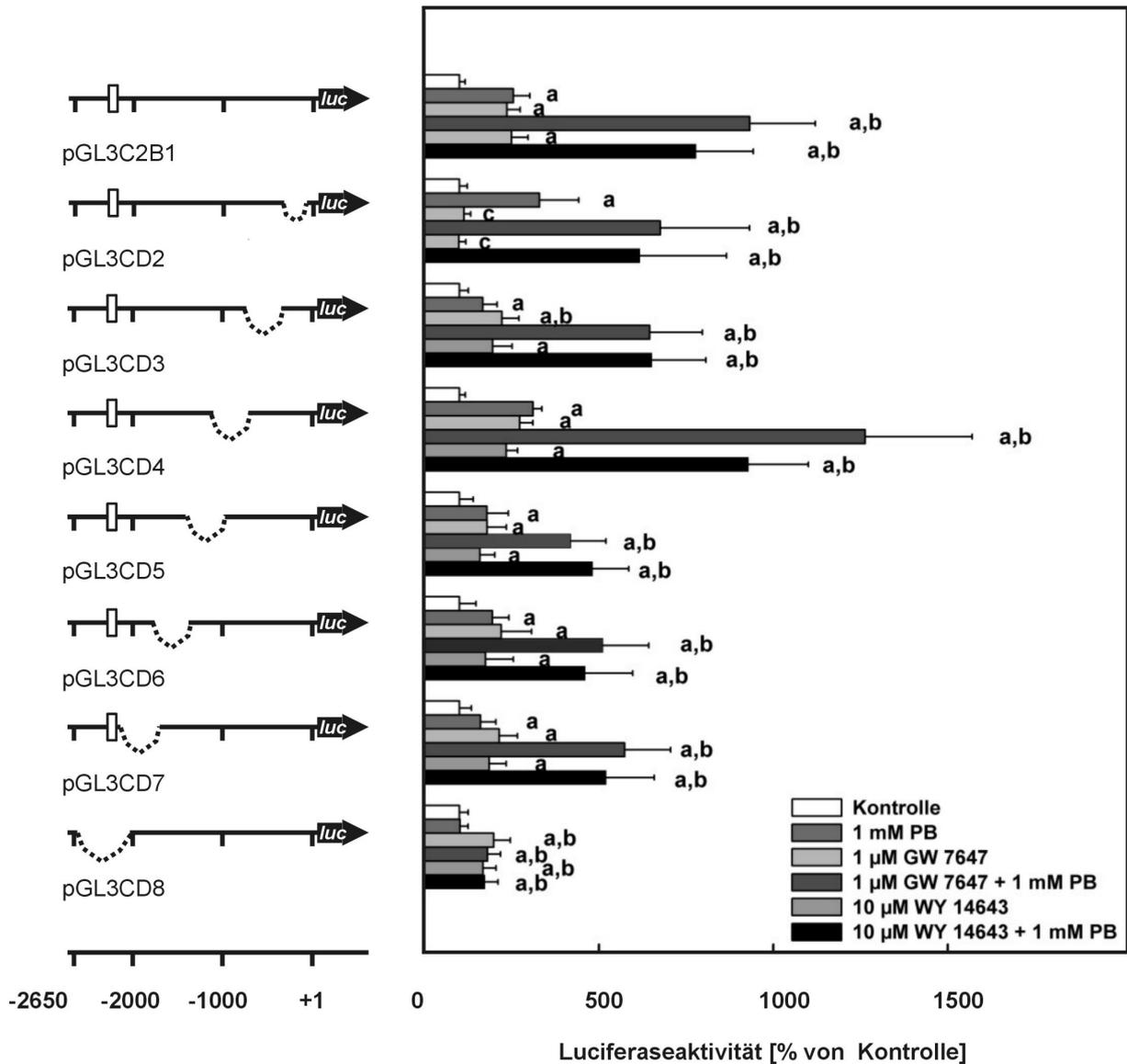


Abb. 17: Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CYP2B1-Promotoraktivierung.

Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter 3.1 beschrieben, isoliert, mit einem der folgenden Ratten CYP2B1-Promotor-Reporterergenkonstrukten, pGL3C2B1 (Wildtyppromotor) und den internen Deletionskonstrukten: pGL3CD2 (-353 bis -176 bp), pGL3CD3 (-701 bis -356 bp), pGL3CD4 (-1063 bis -700 bp), pGL3CD5 (-1451 bis -1075 bp), pGL3CD6 (-1807 bis -1453 bp), pGL3CD7 (-2156 bis -1808 bp) und pGL3CD8 (-2626 bis -2156 bp, kein PBREM) wie unter 3.3.3 beschrieben, transfiziert und dann wie unter Abb. 9. beschrieben kultiviert. Nach 72 h wurden die Zellen lysiert (Promega Luciferase Assay Kit) und 25 µL Zelllysat in den Reporterergen Assay eingesetzt (3.8). Die relative Luciferaseaktivität verhält sich proportional zur Promotoraktivierung. Die Daten sind angegeben in % des Mittelwertes (RFU) aller Kontrollen des jeweiligen Konstruktes. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten, a = signifikant größer als Kontrolle ($p < 0,05$), b = signifikant größer als Kontrolle + PB ($p < 0,05$); c = signifikant kleiner als Kontrolle + PB, t-test für gepaarte Stichproben

4.2.2 Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CAR-Expression

Die PPAR α -Agonisten-vermittelte Steigerung der PBREM-abhängigen CYP2B1-Transkription, könnte durch eine gesteigerte CAR-Expression verursacht werden. Daher wurde die CAR-mRNA- und die CAR-Protein-Expression in PB- und PPAR α -Agonisten behandelten Hepatozyten untersucht (3.2.4). Zunächst wurde die CAR-mRNA-Expression mit Hilfe der Real-Time RT-PCR bestimmt (3.10). Da CAR in der Ratte in mehreren verschiedenen CAR-Spleißvarianten vorkommt, von denen nur der Wildtyp in der Leber funktionell ist, war es trotz unterschiedlicher Oligonucleotidwahl nicht möglich eine eindeutige scharfe Bande zu erzielen. QPCRs mit den unterschiedlichen Oligonucleotid-Paaren zeigten jedoch immer dieselbe Tendenz (nicht gezeigt). Der Quotient aus CAR-mRNA Kopienzahl und der mRNA Kopienzahl

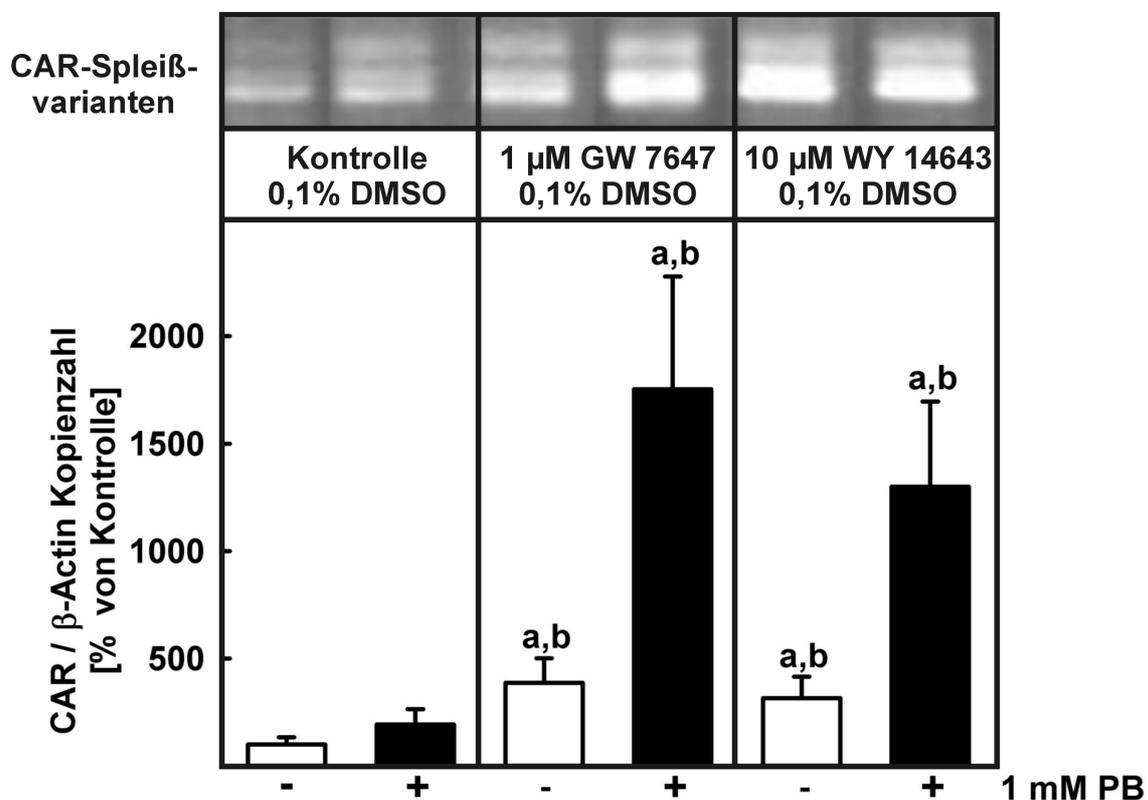


Abb. 18: Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CAR-mRNA-Expression.

Hepatozyten der Ratte wurden, wie in Abb. 9 beschrieben, kultiviert. RNA wurde mittels Säulenaffinitätschromatographie isoliert und als Matrize für oligo(dT) gestartete cDNA Synthese benutzt. Für Standardreihen wurden in Vektoren ligiertes, CAR und β -Actin in bekannter Ausgangskopienzahl in die PCR eingesetzt. 40 Zyklen der Real-time PCR wurde mit spezifischen Oligonucleotiden für Ratten-CAR oder β -Actin durchgeführt (3.10) und der Schwellenzyklus Ct in der logarithmischen Phase der Amplifikation bestimmt. Anhand der rCAR- und β -Actin-Standardreihen wurde die tatsächliche Kopienzahl bestimmt. Die rCAR-Kopienzahlen wurde in das Verhältnis zu den β -Actin-Kopienzahlen gesetzt. Die Ergebnisse sind dargestellt in % von der Kontrolle. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten. a = signifikant unterschiedlich von Kontrolle ($p < 0,05$), b = signifikant unterschiedlich von Kontrolle + PB ($p < 0,05$) (t-test für gepaarte Stichproben).

des „house keeping“-Gen β -Actin in Kontroll-Hepatozyten betrug $2,49 \cdot 10^{-04}$ und wurde 100 % gleichgesetzt (Abb. 18). Die CAR mRNA-Expression wurde in PB-behandelten Hepatozyten verstärkt (Abb. 18). Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant. Nach Behandlung der Hepatozyten mit GW 7647 (1 μ M) oder WY 14643 (10 μ M) wurde die CAR mRNA-Expression signifikant induziert (386 % bzw. 315 %). Zusätzliche Behandlung mit 1 mM PB verstärkte die PPAR α -Agonisten-vermittelten Induktion um mehr als das Vierfache (Abb. 18). Im Western Blot mit einem Antikörper gegen die Aminosäuren 48-197 des N-Terminus von CAR in Lysaten der Hepatozytenkulturen wurde untersucht, ob sich der beobachtete Anstieg an CAR mRNA auch in einem Anstieg von CAR-Protein widerspiegelt (3.5 und 3.7). Die Protein-Expression von CAR in Kontroll-Hepatozyten wurde 100 % gleichgesetzt (Abb. 19). Behandlung der Hepatozyten mit PB oder den PPAR α -Agonisten GW 7647 bzw. WY 14643 steigerte der CAR-Protein-Expression signifikant auf 163 %, 188 % bzw. 169 % (Abb. 19). PB-Behandlung konnte im Widerspruch zur Steigerung der PPAR α -Agonisten-vermittelten Induktion der CAR-mRNA-Expression (Abb. 18) die PPAR α -Agonisten-vermittelten Steigerung

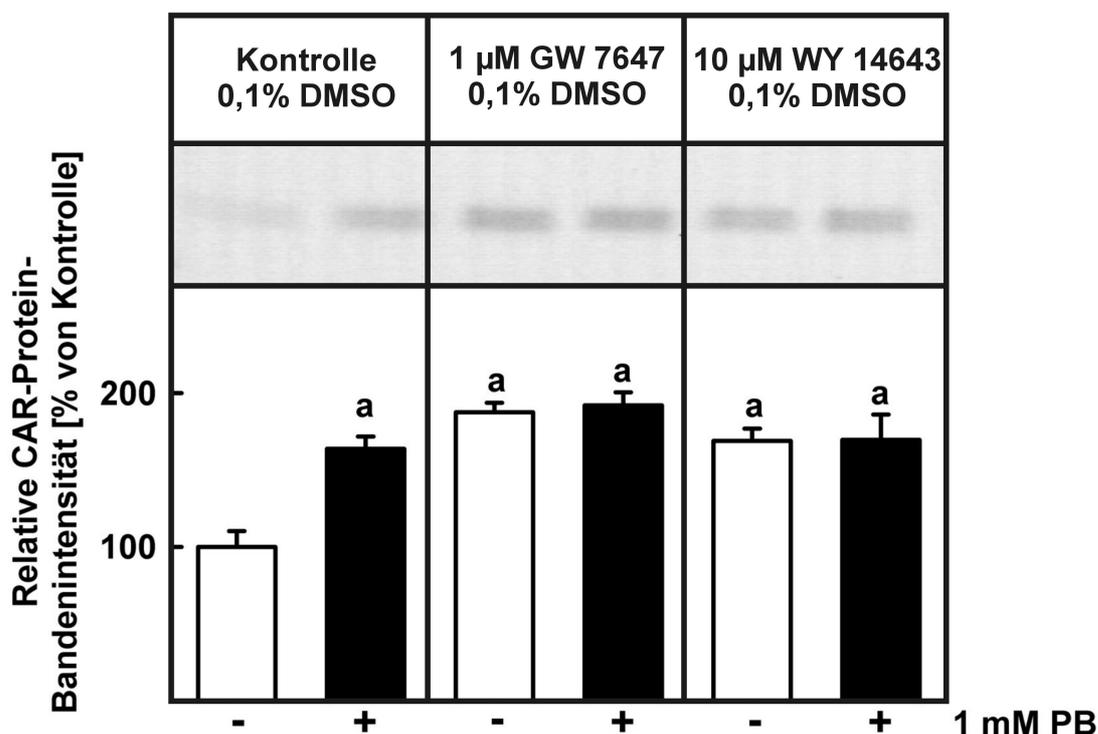


Abb. 19: Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die CAR-Protein-Expression.

Hepatozyten der Ratte wurden, wie in Abb. 9 beschrieben, kultiviert. Lysate wurden hergestellt und der Gesamtproteingehalt nach der BRADFORD-Methode bestimmt. 30 μ g Protein wurden im Westernblot mithilfe polyklonaler Maus IgG Antikörper gegen Ratten-CAR und einem Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper und dem ECL-System detektiert (3.7). Die spezifischen Banden wurden mit dem Software Programm Quantity One der Firma Biorad quantifiziert. Bestimmt wurde das Verhältnis der einzelnen absoluten CAR-Protein-Bandenintensität zur gesamten absoluten CAR-Bandenintensität. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei unabhängigen Experimenten angegeben in % von Kontrolle. Ein repräsentativer Blot ist gezeigt. a = signifikant größer als Kontrolle ($p < 0,05$), t-test für gepaarte Stichproben.

der CAR-Protein-Expression nicht zusätzlich verstärken (Abb. 19). Matsumura und Omura fanden, dass Behandlung mit PB mRNA stabilisieren konnte (Matsumura und Omura, 1973). Möglicherweise wurden auch einige CAR-Spleißvarianten PB-abhängig in mRNA transkribiert nicht jedoch in Protein translatiert.

4.2.3 Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die Aktivierung des Ratten CAR-Promotors

4,4 kb, 2,6 kb oder 1,9 kb des Ratten-CAR-Promotors wurden in einen Luciferase-Reportergen-Vektor (pGL3basic) ligiert (3.12). Kultivierte Hepatozyten (3.3.3) wurden mit diesen Reportergenplasmiden (pGL3rCARprom4,4, pGL3rCARprom2,6, pGL3rCARprom1,9) oder pGL3basic transfiziert (3.3.3). Die weitere Inkubation wurde wie im Standardexperiment durchgeführt (3.2.4). Wie zu erwarten, wurde in Ratten-Hepatozyten, die mit dem leeren Reportergenvektor transfiziert wurden, weder nach Behandlung mit PB noch mit PPAR α -Agonisten eine Aktivierung der Transkription des Reportergens festgestellt. Bei allen drei verschiedenen CAR-Promotorkonstrukten wurde die Luciferaseaktivität in Kontroll-Hepatozyten (0,1 % DMSO) 100 % gleichgesetzt (Abb. 20). Alle drei Konstrukte, das heißt Reportergenplasmide mit 4,4 kb, 2,6 kb oder 1,9 kb des proximalen CAR-Promotors, verhielten sich im Experiment ähnlich. So konnte Behandlung der Hepatozyten mit PB keines der CAR-Promotor-Reportergenkonstrukte aktivieren (Abb. 20). Allerdings induzierten beide PPAR α -Agonisten unabhängig von PB in den drei CAR-Promotor-Konstrukten die Luciferasegen-Transkription ähnlich stark, so wurde die Transkription in Hepatozyten, die mit GW 7647 (1 μ M) oder WY 14643 (10 μ M) inkubiert worden waren, etwa auf das 2- bis 2,5-fache gesteigert (Abb. 20). Da das Luciferasegen im 1,9 kb-CAR-Promotorkonstrukt genauso stark wie im 4,4 kb-CAR-Promotorkonstrukt transkribiert wurde, müssen das oder die PPAR α -Agonisten-responsiven Elemente in den 1,9 kb des proximalen Promotorfragments vorliegen.

Die vorangegangenen drei Experimente zur CAR-Expression in Hepatozyten wurden unter den Bedingungen für die optimale CYP2B1-Expression unter Verwendung einer Insulinkonzentration von 870 nM durchgeführt. Die mit einem Reportergenvektor unter der Kontrolle von 1,9 kb des Ratten-CAR-Promotors (pGL3rCARprom1,9) transfizierten Hepatozyten (3.3.3) wurden für die Dauer des Experiments in Medium mit dieser unphysiologisch hohen Insulinkonzentration oder Medium mit einer tatsächlich in der Pfortader, und damit in periportalen Hepatozyten auftretenden Insulinkonzentration von 0,5 nM kultiviert. Nach 24 h wurden die Hepatozyten zur Hälfte, wie angegeben, mit 1 mM PB und nach 48 h zusätzlich mit WY 14643 (10 μ M) oder DMSO (0,1 %) behandelt. Die Aktivierung des CAR Promotors durch WY 14643 fiel in den Hepatozyten, die mit 0,5 nM Insulin behandelt wurden, dreimal so stark aus, als in Hepatozyten, die mit 870 nM Insulin behandelt wurden

(Abb. 21). Wobei die basale Promotoraktivität in den mit 870 nM Insulin behandelten Hepatozyten tendentiell etwas höher war (nicht gezeigt). Für alle nachstehenden Versuche zur CAR-Promotoraktivität wurden die Hepatozyten in Medium mit 0,5 nM Insulin kultiviert.

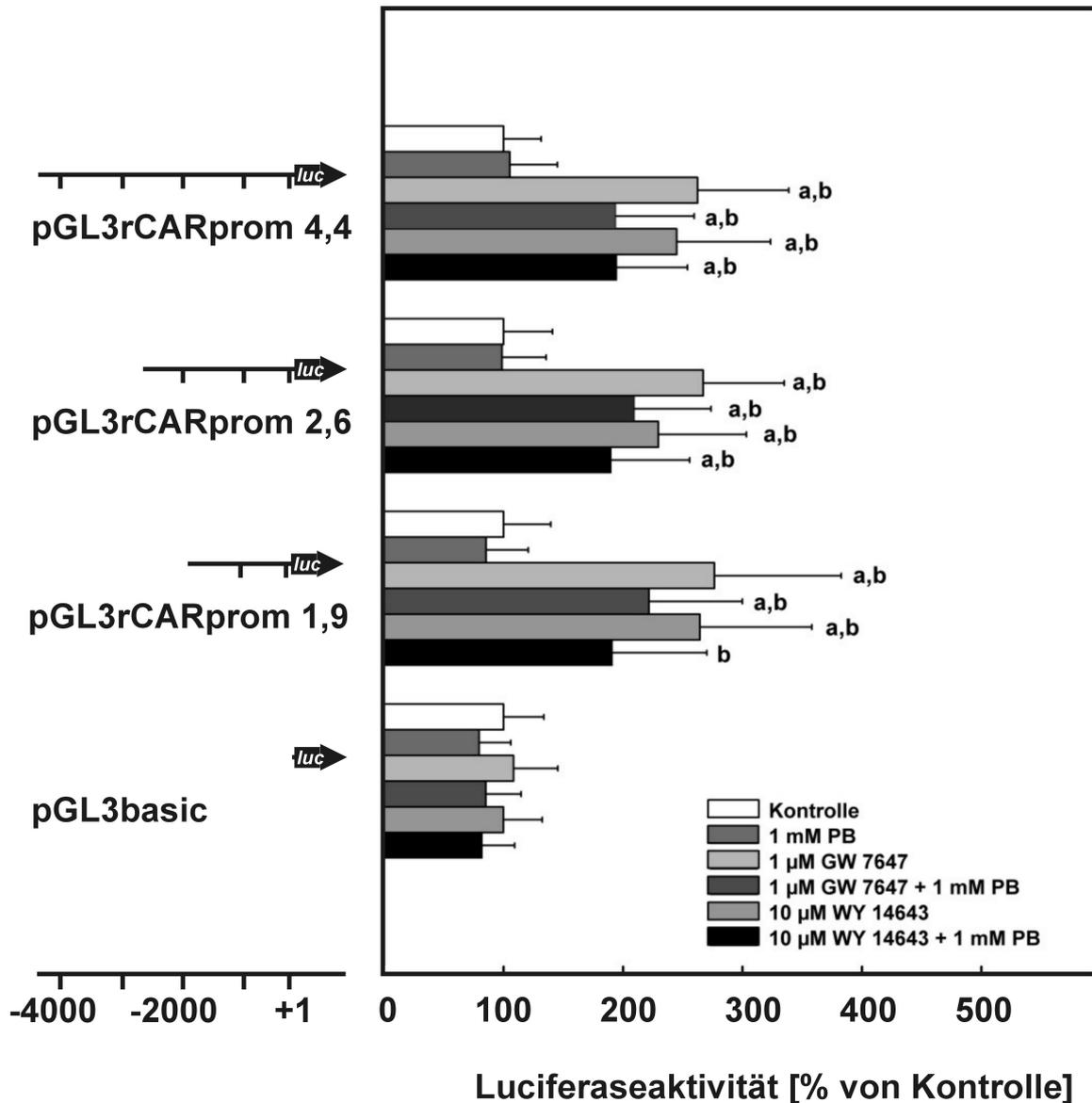


Abb. 20: Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf die rCAR-Promotoraktivität.

Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter 3.1 beschrieben, isoliert, mit einem der folgenden Ratten CAR-Promotor-Reportergenkonstrukte, die 4,4 kb, 2,6 kb oder 1,9 kb des Ratten-CAR-Promotors enthielten transfiziert (3.3.3) und dann wie unter Abb. 9. beschrieben kultiviert. Nach 72 h wurden die Zellen lysiert (Promega Luciferase Assay Kit) und 25 μ L Zelllysat in den Reportergen Assay eingesetzt (3.8). Die relative Luciferaseaktivität verhält sich proportional zur Promotoraktivierung. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus vier unabhängigen Experimenten als % von der Kontrolle. a = signifikant größer als Kontrolle ($p < 0,05$), b = signifikant größer als Kontrolle + PB ($p < 0,05$), t-test für gepaarte Stichproben.

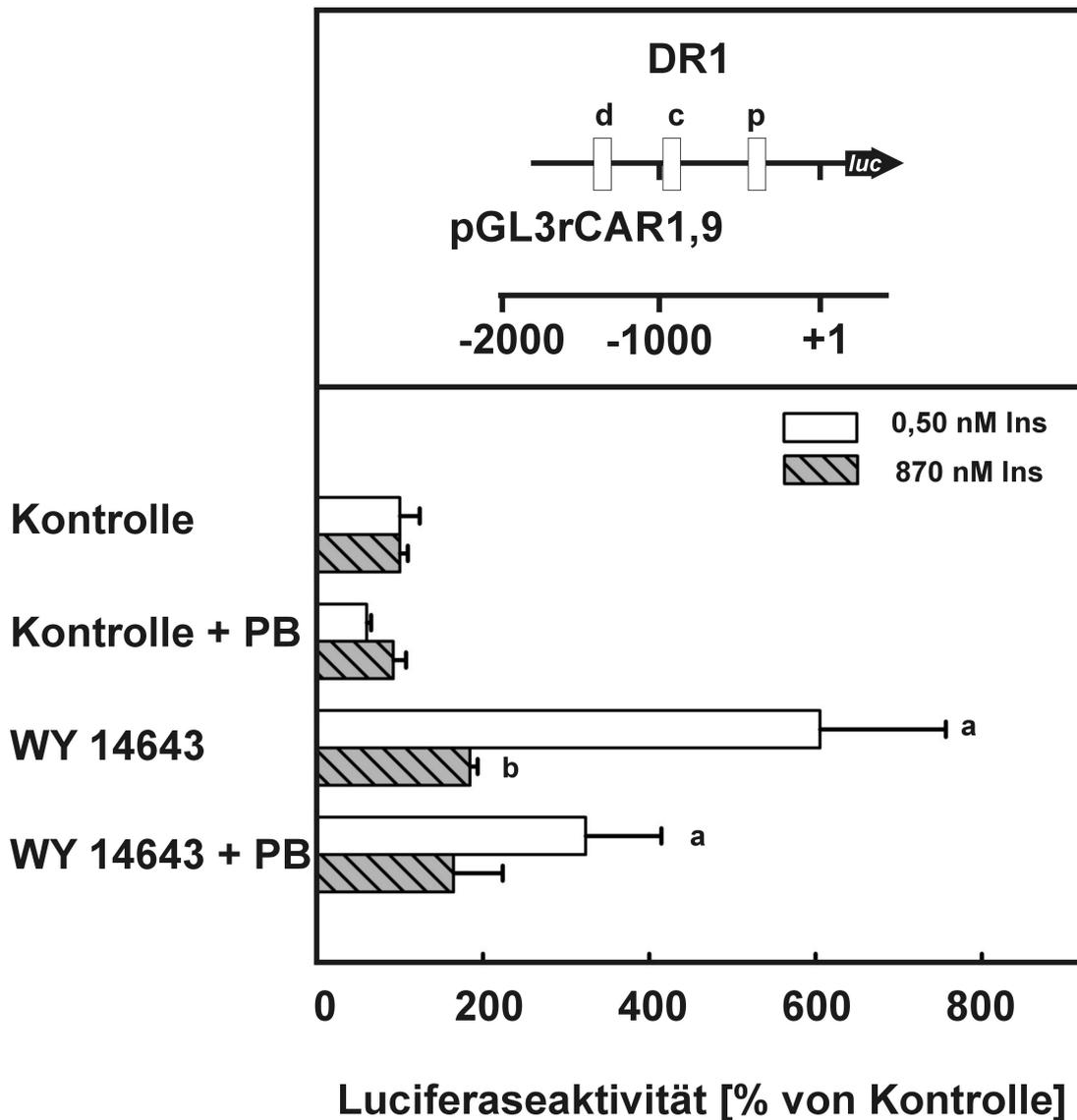


Abb. 21: Der Einfluss von Insulin auf die PPAR α -Agonisten-vermittelte Steigerung der rCAR-Promotoraktivität.

Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter 3.1 beschrieben, isoliert, mit einem Reportergenkonstrukt das 1,9 kb des Ratten-CAR-Promotors enthielt, transfiziert (3.3.3) und in Kulturmedium mit dem Zusatz von 0,5 nM oder 870 nM Insulin kultiviert. Nach 24 h erfolgte wie gekennzeichnet die Behandlung mit 1 mM PB und nach 48 h zusätzlich die Behandlung mit DMSO (0,1 %) bzw. WY 14643 (10 μ M). Nach 72 h wurden die Zellen wie in Abb. 20 beschrieben, aufgearbeitet und getestet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei unabhängigen Experimenten als % von der jeweiligen Kontrolle. a = signifikant größer als Kontrolle (0,5 nM Insulin, $p < 0,05$), b = signifikant größer als Kontrolle (870 nM Insulin, $p < 0,05$), t-test für gepaarte Stichproben.

4.2.4 Die Untersuchung der DR1-Motive im Ratten-CAR-Promotor

PPAR α :RXR α -Heterodimere binden bevorzugt an so genannte „*direkt repeat*“ 1 (DR1)-Motive, das heißt direkte Wiederholungen der mehr oder minder variablen Hexamersequenz AGGTCA, die durch 1 Nukleotid unterbrochen sind. In den 1,9 kb des Ratten-CAR-Promotors „*upstream*“ des mutmaßlichen Transkriptionsstartes (+1) befinden sich drei solche DR1-Motive, ein distales im Bereich von -1569 bis -1557 bp, ein zentrales im Bereich von -942 bis -930 bp und ein proximales im Bereich von -403 bis -391 bp des inklonierten Promotorfragments. Das zentrale und proximale DR1 Motiv sind zwischen Ratte, Maus und Mensch konserviert. Ausgehend von 1,9 kb des Ratten-CAR-Wildtyppromotors wurden nun weitere Deletionskonstrukte hergestellt (3.12). Das Konstrukt pGL3rCARprom1,2 enthielt neben dem proximalen DR1-Motiv gerade noch das zentrale DR1-Motiv, das Konstrukt pGL3rCARprom1,0 gerade nicht mehr das zentrale DR1-Motiv. In transfizierten Hepatozyten wurde untersucht, ob eines der DR1-Motive für die Steigerung der CAR-Promotoraktivität nach Behandlung mit WY 14643 (10 μ M) essentiell ist. Die Hepatozyten wurden entweder mit 1,9 kb, 1,2 kb oder 1,0 kb des Ratten-CAR-Promotors (pGL3rCARprom1,9, pGL3rCARprom1,2, pGL3rCARprom1,0) transfiziert (3.3.3) und für die Dauer des Experiments in Williams E-Kulturmedium mit 0,5 nM Insulin kultiviert. Nach 24 h wurde begonnen, die Hälfte der Hepatozyten mit 1 mM PB zu behandeln. Nach 48 h wurden alle Hepatozyten zusätzlich entweder mit DMSO (0,1 %, Kontrolle) oder WY 14643 (10 μ M) inkubiert. WY 14643 steigerte die Reporterogenaktivität unter der Kontrolle des 1,9 kb und 1,2 kb Ratten-CAR-Promotorfragments mehr als fünffach. PB-Behandlung der Hepatozyten verringerte die PPAR α -Agonisten-vermittelte Transkription des Reportergens tendentiell (nicht signifikant, Abb. 22). Nach Behandlung mit WY 14643 (10 μ M) konnte keine erhöhte Promotoraktivität mehr detektiert werden, wenn die Hepatozyten mit einem Reporterengenvektor transfiziert wurden, der unter der Kontrolle von 1,0 kb des Ratten-CAR-Promotors stand und damit gerade nicht mehr das zentrale DR1-Motiv enthielt (Abb. 22). Daraus wurde geschlossen, dass die Basen im Bereich -1135 bis -927 bp des CAR-Promotors, in dem sich auch das zentrale DR1-Motiv befindet, entscheidend für den positiven Effekt der PPAR α -Agonisten auf die CAR-Transkription sind. Um sicherzugehen, dass es sich dabei tatsächlich um das darin vorkommende zentrale DR1-Motiv handelt, wurden ausgehend vom 1,9 kb Wildtyppromotor weitere Deletionskonstrukte (pGL3rCARprom1,9_ΔDR1d, pGL3rCARprom1,9_ΔDR1c, pGL3rCARprom1,9_ΔDR1p) hergestellt, in denen nur das jeweilige DR1-Motiv deletiert wurde (3.12). Hepatozyten wurden mit diesen Reporterengenvektoren oder pGL3rCARprom1,9 transfiziert (3.3.3) und für die Dauer des Experiments ebenfalls in Williams E-Kulturmedium mit 0,5 nM Insulin kultiviert. Nach 24 h wurde begonnen, die Hälfte der Hepatozyten mit 1 mM

PB zu behandeln, und nach 48 h wurden alle Hepatozyten zusätzlich entweder mit DMSO (0,1 %, Kontrolle) oder WY 14643 (10 μ M) inkubiert. In Übereinstimmung mit dem vorangegangenen Experiment wurde festgestellt, dass nur in dem Konstrukt, in dem das zentrale DR1-Motiv deletiert war (-947 bis -915 bp), im Unterschied zum Wildtyppromotor keine PPAR α -Agonist-vermittelte Steigerung der Reporterogenaktivität gemessen werden konnte (Abb. 23). Das zentrale DR1-Motiv (-AGGTCAgAGAACA-) war von entscheidender Bedeutung bei der Steigerung der CAR-Transkription durch den PPAR α -Agonisten WY 14643.

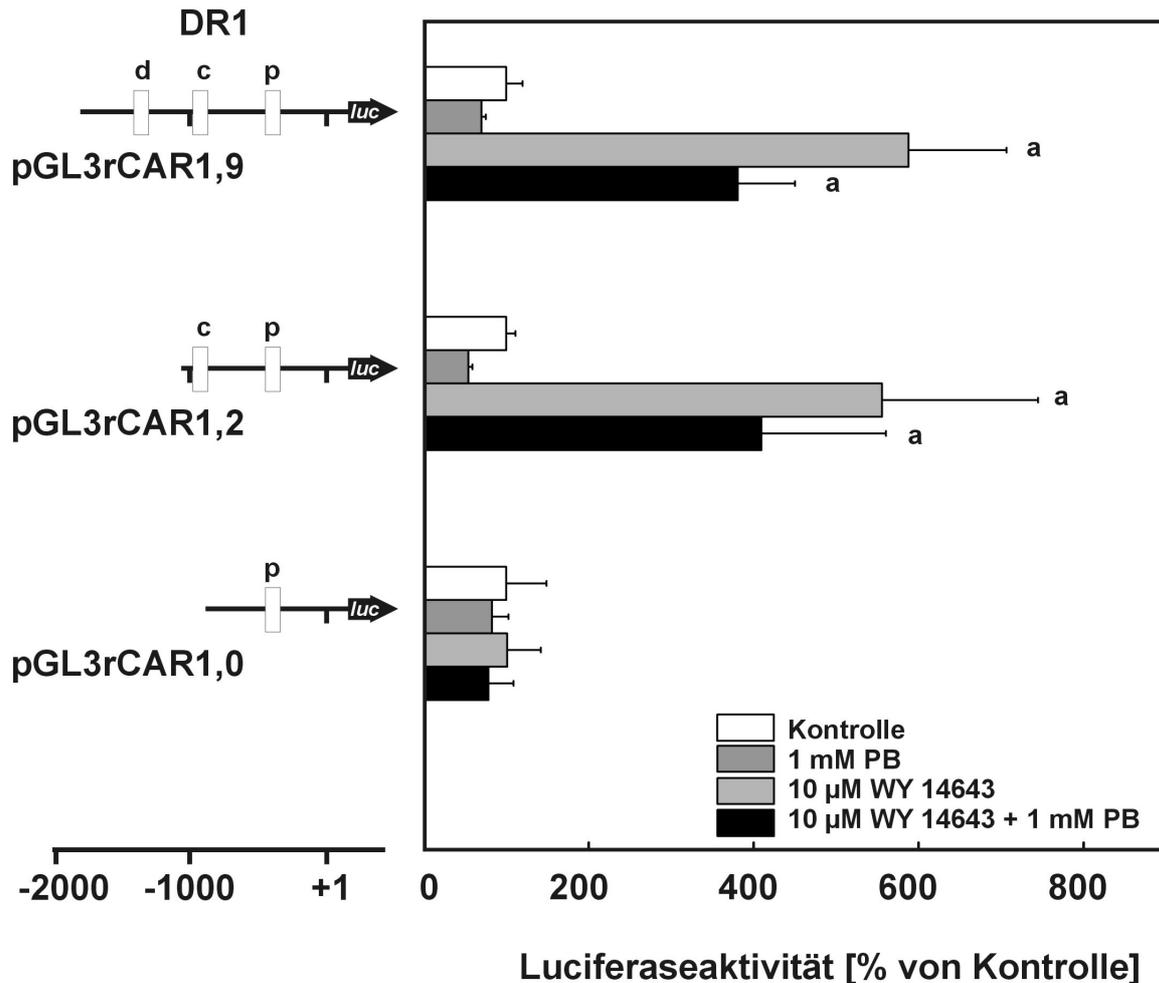


Abb. 22: Der Einfluss des proximalen rCAR-Promotorbereichs auf die PPAR α -Agonisten-vermittelte Promotoraktivierung.

Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter 3.1 beschrieben, isoliert, mit einem der folgenden Ratten CAR-Promotor-Reporterkonstrukten, die 1,9 kb, 1,2 kb oder 1,0 kb des Ratten-CAR-Promotors enthielten, transfiziert (3.3.3) und dann in Kulturmedium mit 0,5 nM Insulin kultiviert. Nach 24 h erfolgte wie gekennzeichnet die Behandlung mit 1 mM PB und nach 48 h zusätzlich die Behandlung mit DMSO bzw. WY 14643 (10 μ M). Nach 72 h wurden die Zellen wie in Abb. 20 beschrieben, aufgearbeitet und getestet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus vier unabhängigen Experimenten als % von der Kontrolle. a = signifikant größer als Kontrolle ($p < 0,05$), t-test für gepaarte Stichproben.

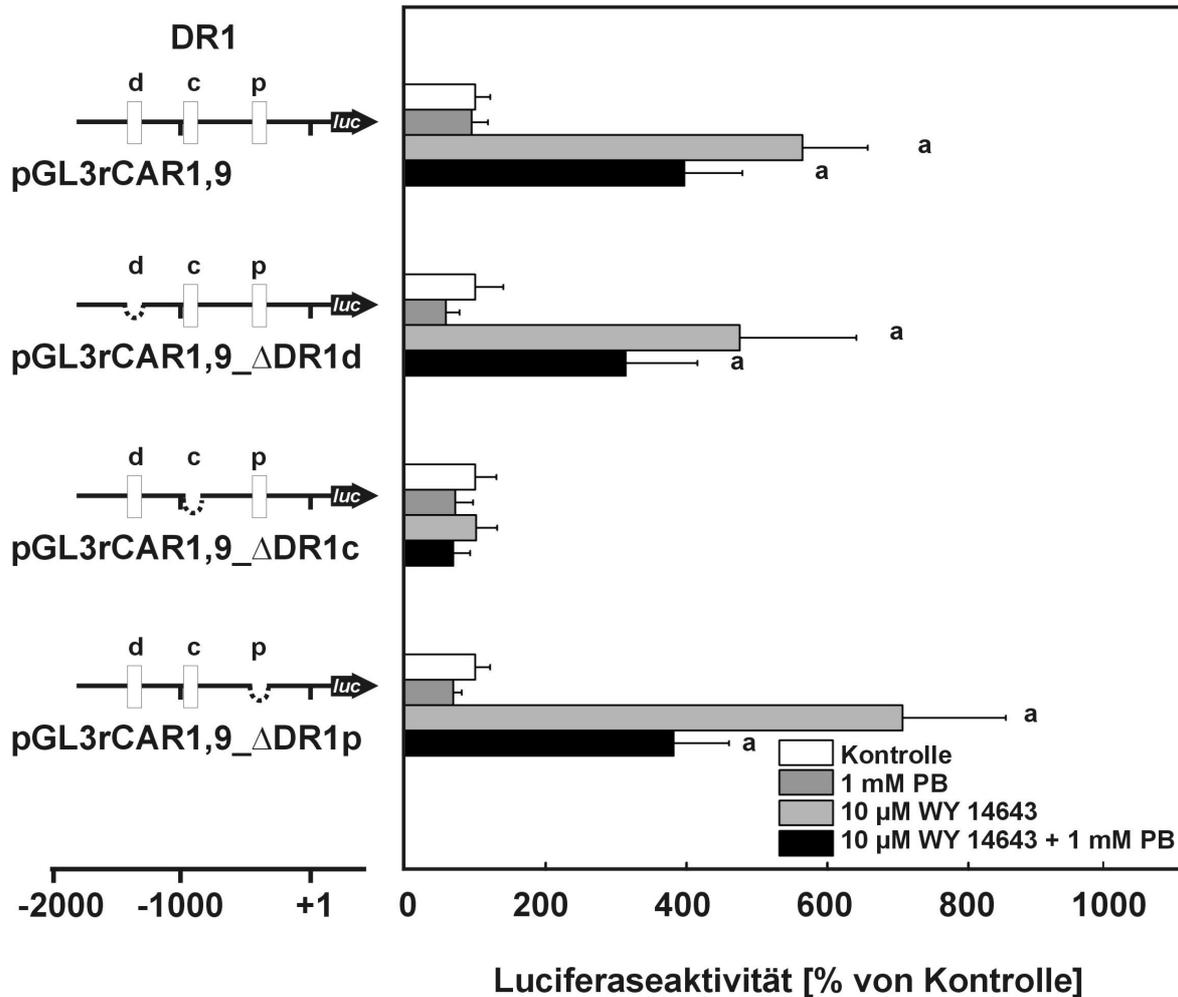


Abb. 23: Der Einfluss der DR1-Motive des rCAR-Promotors auf dessen PPARα-Agonisten-vermittelte Aktivierung.

Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter 3.1 beschrieben, isoliert, mit einem der folgenden Ratten CAR-Promotor-Reporterergenkonstrukten, die 1,9 kb des Ratten-CAR-Promotors enthielten und in denen entweder keines (Wildtyp) oder das distale, zentrale oder proximale DR1-Motiv deletiert war, wie unter 3.3.3 beschrieben, transfiziert und dann wie unter Abb. 22. beschrieben behandelt, aufgearbeitet und getestet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. aus drei unabhängigen Experimenten als % von der Kontrolle. a = signifikant größer als Kontrolle (p < 0,05), t-test für gepaarte Stichproben.

Um die Bedeutung des zentralen DR1-Motives weiter zu bekräftigen, wurden Kernextrakte mit radioaktiv markiertem, doppelsträngigen, zentralen DR1-Oligonukleotid inkubiert und dann in einem EMSA aufgetrennt, visualisiert und densitometrisch ausgewertet (3.22). In den Kontrollen waren deutlich Banden von an Protein gebundenen radioaktiven Oligonukleotid zu sehen (*band shift*), die durch einen 100-fach molaren Überschuss an Kompetitor verdrängt werden konnte (Abb. 24). Auch die CAR-Promotor-Plasmide, die das zentrale DR1-Motiv

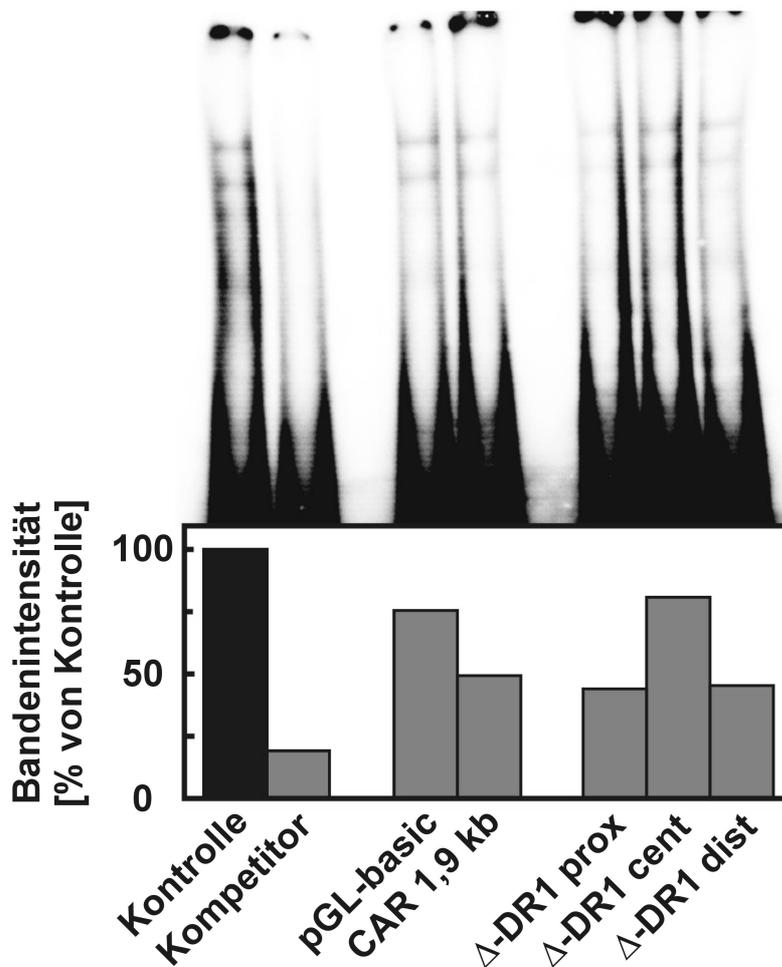


Abb. 24: Die Bindung von Kernproteinen an das zentrale DR1-Motiv.

Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter 3.1 beschrieben, isoliert, dann wie unter 3.22 beschrieben kultiviert. Nach 72 h wurden Kernextrakte gewonnen (3.22.3). Alle Proben wurden mit radioaktiv markiertem doppelsträngigen Oligonukleotid, welches das zentrale DR1-Motiv enthielt, und zusätzlich mit einem 100-fachen Überschuss an Kompetitor oder 20-fachem Überschuss an den oben genannten Plasmiden inkubiert. In einem EMSA wurden die Oligonukleotide und Kernproteine aufgetrennt und im Phospho-Imager visualisiert (3.22.4). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei Experimenten.

enthielten (pGL3rCAR1,9, pGL3rCAR1,9_ΔDR1p und pGL3rCAR1,9_ΔDR1d) waren in 20-fach molarem Überschuss in der Lage das radioaktiv-markierte Oligonukleotide von der Bindung zu verdrängen und damit die Bandenstärke abzuschwächen (Abb. 24). Im Gegensatz dazu verdrängte pGL3basic oder pGL3rCAR1,9_ΔDR1c, welche beide kein zentrales DR1-Motiv enthielten, die Bindung des radioaktiv-markierten Oligonukleotides nicht (Abb. 24). Somit banden Kernproteine spezifisch an das zentrale DR1-Motiv.

Chromatinimmunpräzipitation mit einem PPAR α -spezifischen Antikörper sollte Aufschluss geben, ob PPAR α direkt an das zentrale DR1-Motiv bindet. Dazu wurden Hepatozyten wie unter 3.23 beschrieben, mit WY 14643 (10 μ M) behandelt, die Proteine mittels Formaldehyd mit der DNA vernetzt, die Hepatozyten lysiert und zur Stückelung der genomischen DNA sonifiziert. Dann wurde mit einem PPAR α -spezifischen Antikörper inkubiert und die quervernetzten DNA-PPAR α -Komplexe mit Protein-G-Sepharose immunpräzipitiert. Nach Auflösung der Quervernetzung wurde die DNA säulenaffinitätschromatografisch aufgereinigt und in eine PCR eingesetzt, in der der CAR-Promotorbereich des zentrale DR1-Motiv (-942 bp bis -930 bp; 5'-AGGTCAGAGAACA-3') amplifiziert werden sollte. Zur Kontrolle wurden Immunpräzipitationen mit einem unspezifischen Antikörper und ohne Antikörper durchgeführt. Die nach Immunpräzipitation mit PPAR α -spezifischem Antikörper aufgereinigte DNA enthielt Abschnitte mit dem zentralen DR1-Motiv des CAR-Promotors. Sie konnten mit Hilfe einer PCR mit entsprechenden Oligonukleotiden (CAR-ChIP-1cF: 5'-AGCACGGAAGCTCCAGAATAA GA-3'; CAR-ChIP-2cR: 5'-TTGGTGTCAAGACAGTGGGTAAAG-3'; Produkt= 234 bp) stärker amplifiziert werden als nach der Immunpräzipitation mit unspezifischem Antikörper (Abb. 25). Immunpräzipitation ohne Antikörper führte zu keiner Amplifikation (Abb. 25). Eine nicht-immunpräzipitierte Probe (*Input*) sowie genomische DNA wurden als Kontrollen für das

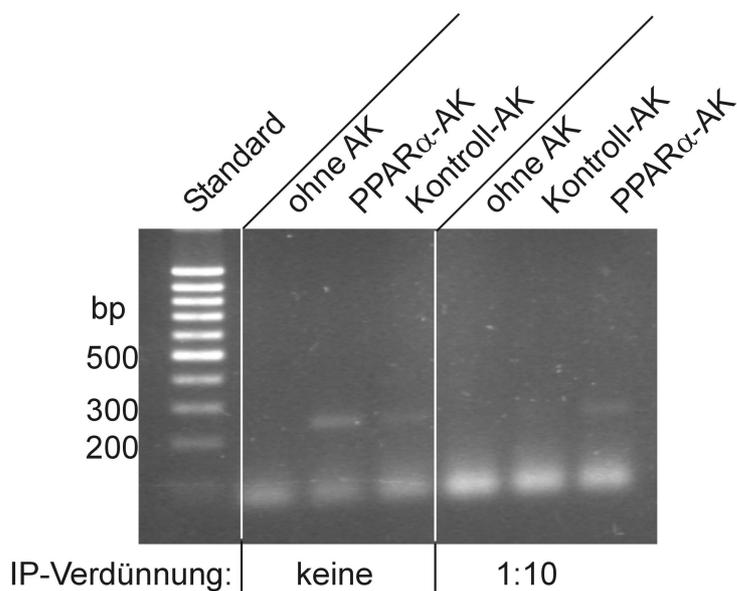


Abb. 25: Die Bindung von PPAR α an das zentrale DR1-Motiv.

Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter 3.1 beschrieben, isoliert, dann für 24 h in Williams-E-Medium kultiviert, 2 h mit WY 14643 (10 μ M) inkubiert, Proteine und DNA mit 1 % Formaldehyd quervernetzt, lysiert, sonifiziert und die Protein-DNA-Fragmente mit einem spezifischen PPAR α -Antikörper oder einem Kontroll IgG immunpräzipitiert (3.23). Die DNA wurde aufgereinigt und in eine PCR zur Amplifikation des zentralen DR1-Motives des CAR-Promotors eingesetzt. Das PCR-Produkt hatte eine Größe von 234 bp. Nach 50 Zyklen wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid im UV-Licht visualisiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment. IP = Immunpräzipitation

Gelingen der PCR eingesetzt und verliefen positiv (nicht gezeigt). Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass PPAR α direkt an das zentrale DR1-Motiv des CAR-Promotors der Ratte bindet.

4.2.5 Der Einfluss des cAMP/PKA-Signalweges auf die PPAR α -Agonisten-vermittelte CAR-Promotoraktivität

DING *et al.* schlagen vor, dass im Fasten, nicht freie Fettsäuren sondern ein Adrenalinanstieg als Signal dient, die CAR-Expression zu steigern. Sie zeigten, dass in Hepatozyten nach Behandlung mit 100 nM Adrenalin, welches über Gs-gekoppelte Rezeptoren den Signalweg cAMP/ PKA/ CREB aktiviert, der Co-Faktor PGC1 α induziert wird. PGC1 α verstärkte dann die HNF4 α -abhängige CAR-Transkription (Ding, *et al.* 2006). Sie beschrieben ein HNF4 α -responsives Element im Maus-CAR-Promotor. Auch im CAR-Promotor der Ratte befindet sich proximal eine dem HNF4 α -RE homologe Sequenzabfolge (-40 bis -26 bp). Das von DING *et al.* verwendete Maus-CAR-Promotorkonstrukt enthielt den gesamten 5' nicht-translatierten Bereich des 1. Exons der Maus. Daher wurde ein homologes Ratten-CAR-Reportergenkonstrukt pGL3rCARprom2,2_Ding, welches den gesamten 5' nicht-translatierten Bereich des 1. Exons der Ratte (+1 bis +351 bp) enthielt, hergestellt (3.12). Um das Zusammenspiel der beobachteten PPAR α -vermittelten CAR-Transkription mit einer möglichen HNF4 α -vermittelten CAR-Transkription zu vergleichen, wurden Ratten-Hepatozyten mit einem der beiden Konstrukte (pGL3rCARprom2,2_Ding, pGL3rCARprom1,9) transfiziert (3.3.3) und im weiteren Verlauf des Experiments in Williams E-Kulturmedium mit 0,5 nM Insulin kultiviert. Nach 48 h wurden die Hepatozyten wie in den Experimenten von DING *et al.* mit 100 nM Adrenalin, aber auch mit WY 14643 (10 μ M), oder beidem behandelt. Die Promotoraktivität der Reportergenkonstrukte pGL3rCARprom1,9 und pGL3rCARprom2,2_Ding unterschied sich nicht. Nach Behandlung mit WY 14643 wurde sie versechsfacht (Abb. 26). Adrenalin hingegen führte in keinem Fall zur Aktivierung des Reportergens und hemmte sogar die WY 14643-vermittelte Promotoraktivität (Abb. 26). Da dies der Aussage der Veröffentlichung von DING *et al.* widersprach, wurde auch der CAR-mRNA-Spiegel nach Adrenalinbehandlung in den Hepatozyten der Ratte untersucht. Dazu wurden die Hepatozyten (3.2.4) nach der Anheftungsphase (4 h) für die gesamte Dauer des Experiments in Williams E Kulturmedium (0,5 nM Insulin) kultiviert. Nach 24 h Kultur wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, und nach 48 h wurden die Hepatozyten mit 0,1 % (v/v) DMSO, WY 14643 (10 μ M), Adrenalin (10 μ M) oder einer Kombination aus beidem behandelt. Die Ansätze einschließlich einer Kontrolle enthielten 0,1 % (v/v) DMSO. Im Einklang mit den Daten aus der Promotorstudie, steigerte Behandlung der Hepatozyten mit WY 14643 die CAR-mRNA-Expression, Adrenalin hingegen hemmte sowohl die basale Expression als auch den WY 14643-vermittelten Anstieg der CAR-mRNA-Expression (Abb. 27). Ursachen für die Diskrepanz zwischen diesen Daten und den

Ergebnissen von DING *et al.* können zum einen in Speziesunterschieden als auch zum anderen in unterschiedlichen Präparations- und Kulturbedingungen liegen. Die vorliegenden Daten sprechen dafür, dass PPAR α -abhängige und nicht ausschliesslich CREB-abhängige Prozesse zu einer Induktion von CAR und damit zu einer Expression von CAR-Zielgenen führen können. Das Kulturmedium enthielt 0,5 nM Insulin. WY 14643 steigerte die CAR-mRNA-Expression in diesen Versuchen (0,5 nM Insulin) 10-fach stärker als in den vorangegangenen Experimenten (Abb. 18), in denen dem Kulturmedium das für die CYP2B-Expression vorteilhafte ITS zugesetzt war (Abb. 27).

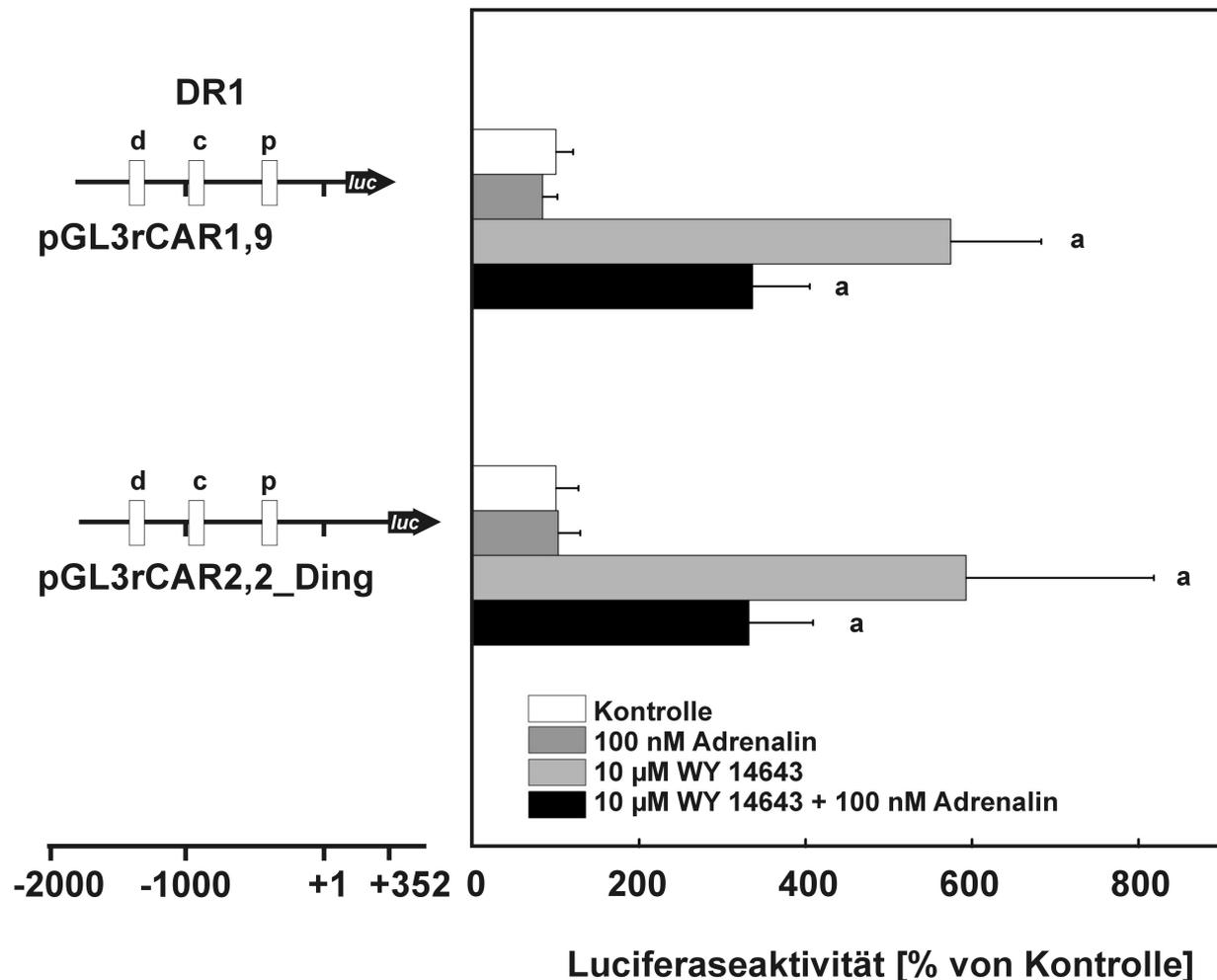


Abb. 26: Der Einfluss des cAMP/PKA-Signalweges auf die PPAR α -Agonisten-vermittelte CAR-Promotoraktivität.

Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter 3.1 beschrieben, isoliert, mit dem Ratten CAR-Promotor-Reporter-genkonstrukt welches 1,9 kb oder 2,2 kb (DING *et al.* 2006) des Ratten-CAR-Promotors enthielt, transfiziert (3.3.3), für die gesamte Dauer des Experiments in Williams E Kulturmedium (0,5 nM Insulin) kultiviert, nach 48 h entweder mit Adrenalin (100 nM), dem PPAR α -Agonisten WY 14643 (10 µM) oder beidem behandelt und nach 72 h lysiert (Promega Luciferase Assay Kit) und 25 µL Zelllysat in den Reporter-gen Assay (3.8) eingesetzt. Die relative Luciferaseaktivität verhält sich proportional zur Promotoraktivierung. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten als % von der Kontrolle. a = signifikant größer als Kontrolle ($p < 0,05$), t-test für gepaarte Stichproben.

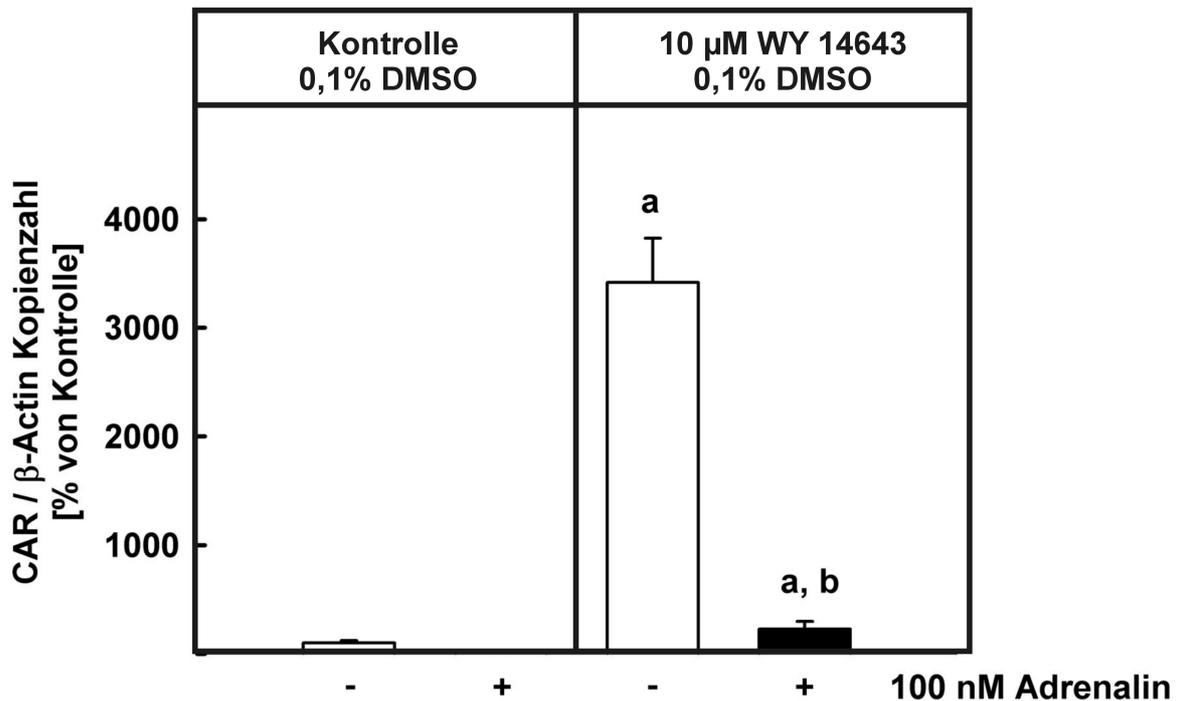


Abb. 27: Der Einfluss des cAMP/PKA-Signalweges auf die PPAR α -Agonisten-vermittelte CAR-mRNA-Expression.

Kultivierte Hepatozyten der Ratte (3.2.4) wurden für die gesamte Dauer des Experiments in Williams E Kulturmedium (0,5 nM Insulin) kultiviert und nach 48 h entweder mit Adrenalin (100 nM), dem PPAR α -Agonisten WY 14643 (10 μ M) oder beidem behandelt. RNA wurde mittels Säulenaffinitätschromatographie isoliert und als Matrize für oligo(dT) gestartete cDNA Synthese benutzt. Für Standardreihen wurden in Vektoren ligiertes, CAR und β -Actin in bekannter Ausgangskopienzahl in die PCR eingesetzt. 40 Zyklen der Real-time PCR wurde mit spezifischen Oligonucleotiden für Ratten-CAR oder β -Actin durchgeführt (3.10) und der Schwellenzyklus Ct in der logarithmischen Phase der Amplifikation bestimmt. Anhand der rCAR- und β -Actin-Standardreihen wurde die tatsächliche Kopienzahl errechnet und die rCAR-Kopienzahlen in das Verhältnis zu den β -Actin-Kopienzahlen gesetzt. Die Ergebnisse sind dargestellt in % von der Kontrolle. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten. a = signifikant unterschiedlich von Kontrolle ($p < 0,05$), b = signifikant unterschiedlich von WY 14643 ($p < 0,05$), t-test für gepaarte Stichproben.

4.2.6 Die PBREM-unabhängige Aktivierung des CYP2B1-Promotors durch PPAR α -Agonisten

PPAR α -Agonisten steigerten die Aktivität eines Reportergens unter der Kontrolle des CYP2B1-Promotors nicht nur CAR-vermittelt und PBREM-abhängig sondern auch PBREM-unabhängig über die Aktivierung des proximalen CYP2B1-Promotorbereichs von -353 bis -176 bp. Um diesen PPAR α -Agonisten-Eigeneffekt näher charakterisieren zu können, wurden ausgehend vom Wildtyppromotorkonstrukt pGL3C2B1 weitere Deletions-Reportergenkonstrukte hergestellt (3.13), die diesen Bereich von -353 bis -176 bp näher charakterisieren sollten. SWALES et al. beschrieben im proximalen humanen CYP2B6 Promotor ein Okadainsäure-responsives Element. Im Bereich von -266 bis -252 bp des Ratten

CYP2B1 Promotors wurde eine Sequenz gefunden, die zu 69 % identisch war. Nähere Computeranalyse des Bereichs von -353 bis -176 bp mit Hilfe des NHR-scans (http://mordor.cgb.ki.se/cgi-bin/NHR-scan/nhr_scan.cgi) konnte ein potentielles PPRE im Bereich von -300 bp bis -280 bp und ein potentielles ER4-Motiv im Bereich von -216 bp bis -201 bp detektieren. Daher wurde die Deletion in drei Abschnitte untergliedert, die jeweils ein potentielles Merkmal enthielten. Abschnitt 1 (-353 bis -260 bp) enthielt das PPRE (schwarze Box), Abschnitt 2 (-261 bis -235 bp) das OARE (dunkelgraue Box) und Abschnitt 3 (-236 bis -176 bp) das ER4-Motiv (hellgraue Box). Folgende Deletions-Reportergergenkonstrukte (Deletion in Klammern) wurden synthetisiert, pGL3CD2A (-260 bis -176 bp), pGL3CD2B (-235 bis -176 bp), pGL3CD2C (-353 bis -244 bp), pGL3CD2D (-353 bis -280 bp) und pGL3CD2E (-260 bis -244 bp). Zusätzlich wurden aus dem Wildtyp die Konstrukte pGL3C2B1_PPRE_mut (-295 bis -292 bp, Mutation von cttt nach AGCG) und pGL3C2B1_ER4_mut (-216 bis -201 bp, Mutation von t gag ctg aca agt gca nach C AGg cCg aca TTC gcT) hergestellt, in welchen die mutmaßlichen Erkennungssequenzen durch zielgerichtete Punktmutationen zerstört wurden. Zum Vergleich wurden Hepatozyten nicht nur mit diesen neuen Konstrukten, sondern auch mit dem Wildtyp pGL3C2B1 und das pGL3CD2 Deletionskonstrukt transfiziert (3.3.3), welche ausführlich in Abb. 17 beschrieben wurden. Die transfizierten Hepatozyten wurden wie im Standardexperiment mit den PPAR α -Agonisten behandelt (3.2.4). Alle getesteten Reportergergenkonstrukte wurden durch Behandlung der Hepatozyten (3.2.4) mit PB signifikant aktiviert (Abb. 28). Ausserdem wurde die PB-abhängigen Aktivierung der Transkription in allen Konstrukten nach zusätzlicher Behandlung mit PPAR α -Agonisten mindestens verdoppelt (Abb. 28). Der PBREM-abhängige Weg der Steigerung der Transkription durch PPAR α -Agonisten war demnach in allen Konstrukten intakt (Abb. 28).

Zunächst wurde das pGL3CD2A Konstrukt, in welches Abschnitt 1 mit dem potentiellen PPRE reinsertiert wurde, auf den PBREM-unabhängigen PPAR α -Agonisten-Eigeneffekt hin untersucht. Es verhielt sich wie das pGL3CD2-Konstrukt (Abb. 28). Somit spielt der Bereich von -353 bis -260 bp keine Rolle bei der PBREM-unabhängigen Aktivierung durch PPAR α -Agonisten. Auch das Konstrukt pGL3CD2B (Abschnitt 1 und 2) verhielt sich ähnlich dem pGL3CD2 Konstrukt, obwohl beide PPAR α -Agonisten allein zu einem signifikanten, wenn auch sehr geringen Unterschied (GW 7647 136 %, WY 14643 127 %) gegenüber der Kontrolle führten, war die Aktivierung immernoch signifikant geringer als die mit PB, der Bereich von -280 bis -240 bp hat, wenn dann nur geringe Bedeutung für den PBREM-unabhängigen PPAR α -Effekt (Abb. 28). Das Konstrukt pGL3CD2C, welches nur Abschnitt 3 und damit das potentielle ER4-Motiv enthielt, verhielt sich erstaunlicher Weise wie der Wildtyp (Abb. 28). Behandlung mit den PPAR α -Agonisten verdoppelte die Promotoraktivität (Abb. 28). Auch das Deletionskonstrukt pGL3CD2D welches zusätzlich zum Abschnitt 3 auch den Abschnitt 2, also das potentielle ER4- und das potentielle OARE-Motiv, enthielt, reagierte wie der Wildtyp auf die Behandlung mit PB und/oder PPAR α -Agonisten (Abb. 28). Beide PPAR α -Agonisten

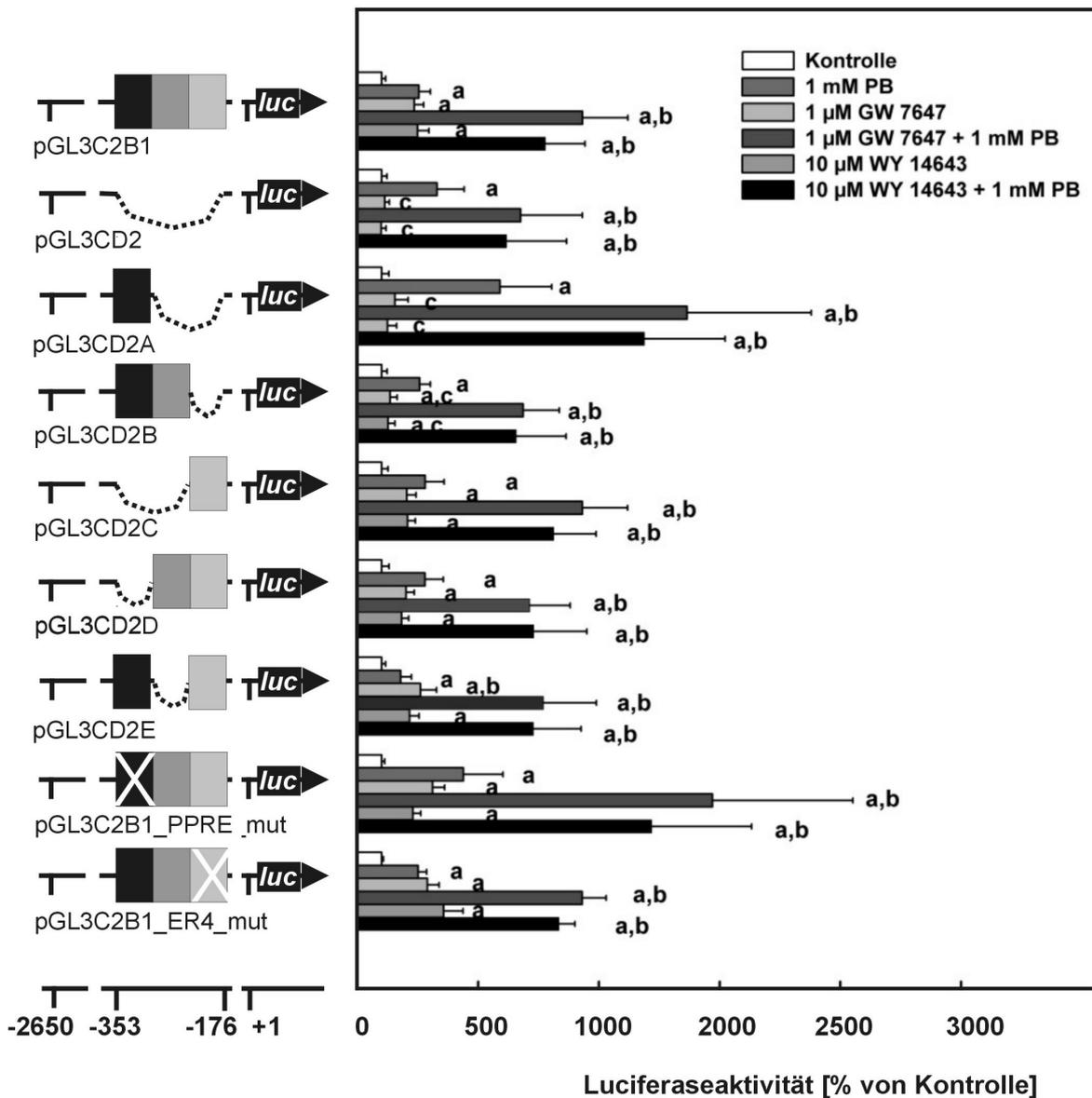


Abb. 28: Der Einfluss von PPAR α -Agonisten auf Aktivierung des proximalen CYP2B1-Promotorbereichs.

Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter 3.1 beschrieben, isoliert, mit einem der folgenden Ratten CYP2B1-Promotor-Reporterergenkonstrukten, pGL3C2B1 (Wildtyppromotor) und den internen Deletionskonstrukten: pGL3CD2 (-353 bis -176 bp), pGL3CD2A (-260 bis -176 bp), pGL3CD2B (-235 bis -176 bp), pGL3CD2C (-353 bis -244 bp), pGL3CD2D (-353 bis -280 bp), pGL3CD2E (-260 bis -244 bp), pGL3C2B1_PPRE_mut (-295 bis -292 bp, Mutation von cttt nach AGCG), pGL3C2B1_ER4_mut (-216 bis -201 bp, Mutation von t gag ctg aca agt gca nach C AGg cCg aca TTC gcT) wie unter 3.3.3 beschrieben, transfiziert und dann wie unter Abb. 9. beschrieben behandelt. Nach 72 h wurden die Zellen lysiert (Promega Luciferase Assay Kit). und 25 μ L Zelllysat in den Reporterergen Assay eingesetzt (3.8). Die relative Luciferaseaktivität verhält sich proportional zur Promotoraktivierung. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus mindestens vier unabhängigen Experimenten als % von der Kontrolle. a = signifikant größer als Kontrolle ($p < 0,05$), b = signifikant größer als Kontrolle + PB ($p < 0,05$); c = signifikant kleiner als Kontrolle + PB, t-test für gepaarte Stichproben.

aktivierten den Promotor (Abb. 28). Das Konstrukt pGL3CD2E enthielt Abschnitt 1 und wiederum Abschnitt 3. Auch dieses Reporterengenkonstrukt verhielt sich wie der Wildtyp. Beide PPAR α -Agonisten verdoppelten die Promotoraktivität (Abb. 28). Behandlung mit GW 7647 steigerte diesmal die Promotoraktivität sogar signifikant stärker als PB (Abb. 28). Gemeinsames Merkmal der Deletionskonstrukte pGL3CD2C bis E war Abschnitt 3 mit dem potentiellen ER4-Motiv. Alle drei verhielten sich wie der Wildtyp. Offensichtlich enthält der Bereich von -236 bis -176 bp des CYP2B1-Promotors ein Element, welches die PBREM-unabhängige PPAR α -Agonisten vermittelte Aktivierung des CAR-Promotors auslöste. Obwohl schon die Versuche mit dem Konstrukt pGL3CD2A gezeigt hatten, dass das PPRE-Motiv irrelevant war, wurde eine Wildtyp-Mutante konstruiert, in welcher das PPRE ausgeschaltet war und eine in welcher das potentielle ER4-Motiv zerstört war. Erstaunlicherweise verhielten sich sowohl der pGL3C2B1_PPRE_mut-Vektor als auch der pGL3C2B1_ER4_mut-Vektor wie der Wildtyp-Vektor (Abb. 28). Die beobachtete PBREM-unabhängige PPAR α -Agonisten vermittelte Aktivierung des CAR-Promotors erfolgte im Bereich von -236 bis -176 bp, das ER4-Motiv war jedoch nicht an der Aktivierung beteiligt.

4.2.7 Der Einfluss von mRXR α -Überexpression auf die CYP2B1-Promotoraktivität

Sowohl CAR als auch PPAR α benötigen RXR α als Heterodimerisierungspartner, dieser würde bei begrenztem Angebot zu einem limitierenden Faktor. Daher wurde untersucht, ob eine Überexpression von RXR α zu einer weiteren Verstärkung des PPAR α -Effektes beitragen könnte. Hepatozyten wurden zum einen nur mit dem CYP2B1-Wildtyppromotorkonstrukt (pGL3C2B1) und zum anderen zusätzlich mit dem murinen RXR α (pSG5mRXR α), welcher zu 93 % identisch zum Ratten RXR α (M84817; NM_012805; bl2seq) ist, transfiziert (3.3.3). Im Anschluss wurden die Hepatozyten wie im Standardexperiment (3.2.4) mit PB, den PPAR α -Agonisten GW 7647 (1 μ M) bzw. WY 14643 (10 μ M) oder einer Kombination aus PB und PPAR α -Agonist behandelt. Die Luciferaseaktivität war - wahrscheinlich transfektionsbedingt - in den co-transfizierten Hepatozyten deutlich schwächer als in den nur mit dem CYP2B1-Promotor-transfizierten Hepatozyten. Um diesen Unterschied zu verdeutlichen sind die Daten in RFU (Abb. 29 A) und prozentual zur jeweiligen Kontrolle angegeben (Abb. 29 B). Wie bereits beschrieben, steigerten PB, aber auch GW 7647 und WY 14643 allein die Aktivierung des CYP2B1-Promotors auf etwa 300 % und beide PPAR α -Agonisten verdreifachten die PB-abhängige Aktivierung (Abb. 29 B). Im Unterschied zur CYP2B1-Promotoraktivierung in Wildtyp-transfizierten Hepatozyten war in mit mRXR α co-transfizierten Zellen die Reportergenaktivität nach Behandlung mit PPAR α -Agonisten allein und in Kombination mit PB signifikant stärker als nach Behandlung mit PB allein (Abb. 29 B). Die mRXR α -Überexpression und damit vermehrte RXR α -Homodimer-Bildung könnte selbst die PBREM-unabhängige Transkription fördern. Um einen Einfluss der Transfektionsmethode auszuschließen, müsste ein Kontrollexperiment erfolgen, bei dem mit leerem pSG5 Vektor cotransfiziert wird.

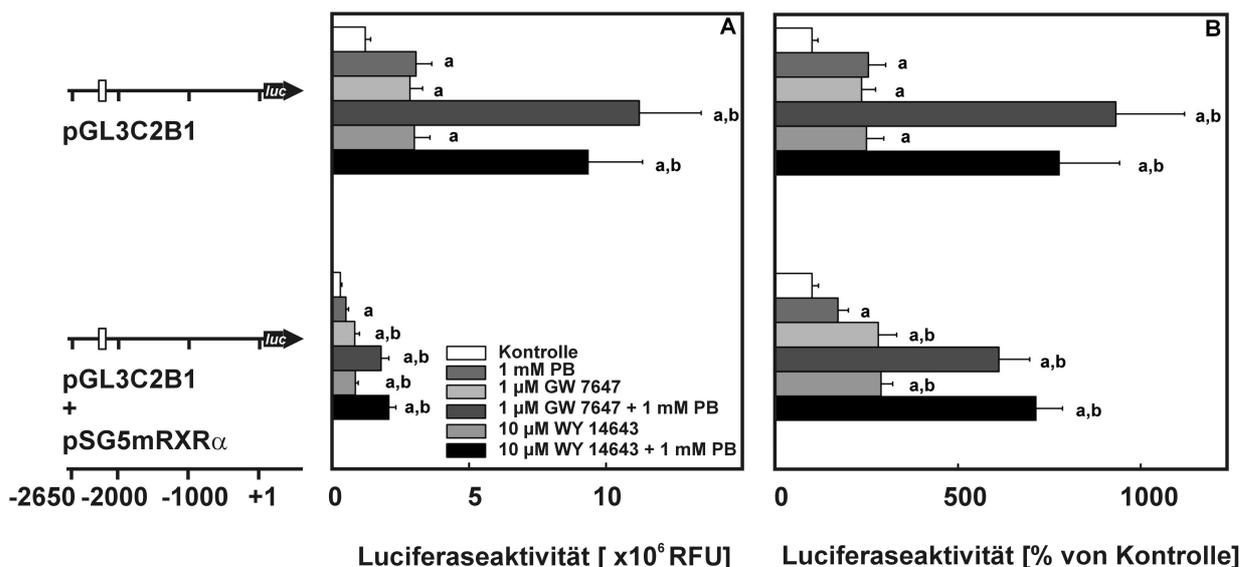


Abb. 29: Der Einfluss von mRXR α -Überexpression auf die CYP2B1-Promotoraktivität.

Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter 3.1 beschrieben, isoliert, mit dem Wildtyp-Ratten-CYP2B1-Promotor-Reportergenkonstrukte, pGL3C2B1 allein oder in Kombination mit dem murinen RXR α -Expressionsplasmid (pSG5mRXR α) wie unter 3.3.3 beschrieben, transfiziert und dann wie unter Abb. 9 beschrieben behandelt. Nach 72 h wurden die Zellen lysiert (Promega Luciferase Assay Kit), und 25 μ L Zelllysate in den Reporterassay eingesetzt (3.8). Die relative Luciferaseaktivität verhält sich proportional zur Promotoraktivierung. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus mindestens vier unabhängigen Experimenten, angegeben: **A** in RFU bzw. **B** als % der Kontrolle. a = signifikant größer als Kontrolle ($p < 0,05$), b = signifikant größer als Kontrolle + PB ($p < 0,05$); t-test für gepaarte Stichproben.

4.3 Der Einfluss von Prostaglandin D₂ auf die Expression des CAR-Zielgens CYP2B1

4.3.1 Der Einfluss von PGD₂ auf die PB-abhängige CYP2B1-Expression

Nachdem der Effekt der PPAR α -Agonisten auf die CYP2B1-Expression anhand von synthetischen PPAR α -Agonisten charakterisiert worden war, wurde untersucht, ob das, von Kupferzellen nach PB-Stimulation vermehrt produzierte, Prostaglandin D₂, welches einen endogenen PPAR α -Agonisten darstellt (Corton et al. 2000), einen Einfluss auf die PB-abhängige CYP2B-Expression hat. Dazu wurden Hepatozyten, wie unter 3.2.4 beschrieben, kultiviert und nach 48 h mit PGD₂ (10 μ M) oder dem synthetischen PPAR α -Agonisten WY 14643 (10 μ M) (Positivkontrolle) behandelt (Abb. 30). Alle Proben und Kontrollen enthielten 0,1 % (v/v). DMSO (Lösungsmittel). Die CYP2B-Protein-Expression war nur in PB-behandelten Hepatozyten nachweisbar. Behandlung mit 1 mM PB führte zu einer detektierbaren CYP2B-Protein-Expression und wurde 100 % gleichgesetzt (Abb. 30). PGD₂ führte genau wie der PPAR α -Agonist WY 14643 in Kombination mit PB zu einer signifikant höheren CYP2B-Expression als PB allein.

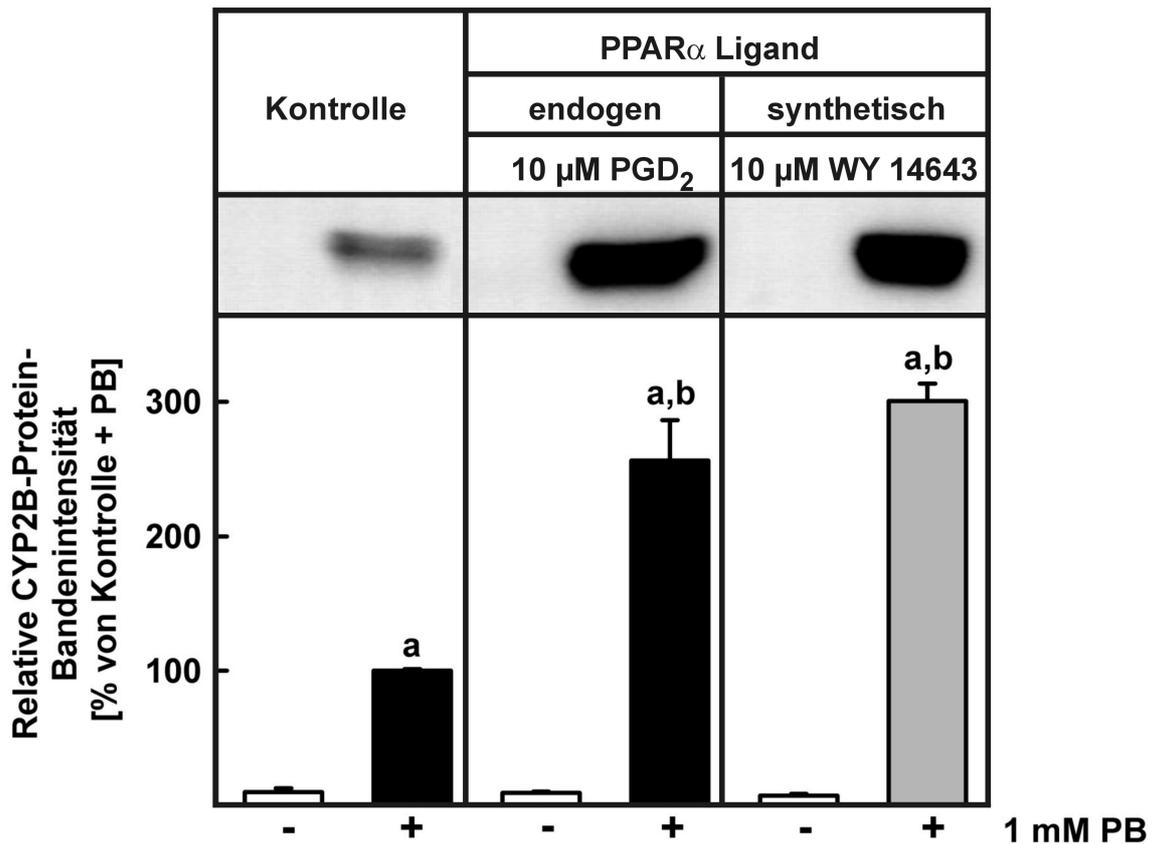


Abb. 30: Der Einfluss von PGD $_2$ auf die PB-abhängige CYP2B1-Expression.

Kultivierte Hepatozyten (3.2.4) der Ratte wurden nach 24 h, wie angegeben zur Hälfte mit 1 mM PB und nach 48 h zusätzlich mit 10 μ M PGD $_2$ oder WY 14643 (10 μ M) behandelt und Mikrosomen präpariert. 50 μ g Protein wurden im Westernblot mithilfe eines monoklonalem Maus IgG Antikörper gegen Ratten-CYP2B, einem Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper und dem ECL-System detektiert (3.7). Die spezifischen Banden wurden mit dem Software Programm Quantity One der Firma Biorad quantifiziert. Angegeben wurde die Intensität jeder einzelnen Bande anteilig zur Gesamtintensität. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei unabhängigen Experimenten angegeben in % von Kontrolle + PB. Ein repräsentativer Blot ist gezeigt. a = signifikant größer als Kontrolle ($p < 0,05$), b = signifikant größer als Kontrolle + PB ($p < 0,05$), t-test für gepaarte Stichproben.

4.3.2 Der Einfluss von PGD $_2$ auf die CYP2B1-Aktivität

Neben der Protein-Expression wurde in den gleichen Mikrosomen die CYP2B-Aktivität in Abhängigkeit von PGD $_2$ untersucht. Auch hier zeichnete sich ein ähnliches Bild ab. In Mikrosomen von nicht PB-behandelten Hepatozyten der Ratte war unabhängig von der PGD $_2$ -Behandlung kaum CYP2B-Aktivität nachweisbar (3.4 und 3.6). Nach Behandlung mit PB wurde eine CYP2B-Aktivität von 10,22 pmol Resorufin/ mg Protein* min detektiert. Diese PB-abhängige CYP2B-Aktivität wurde 100 % gleichgesetzt (Abb. 31). Zusätzliche Behandlung der Hepatozyten mit 10 μ M PGD $_2$ oder dem PPAR α -Agonist WY 14643 verdoppelten die PB-abhängige CYP2B-Aktivität signifikant (Abb. 31).

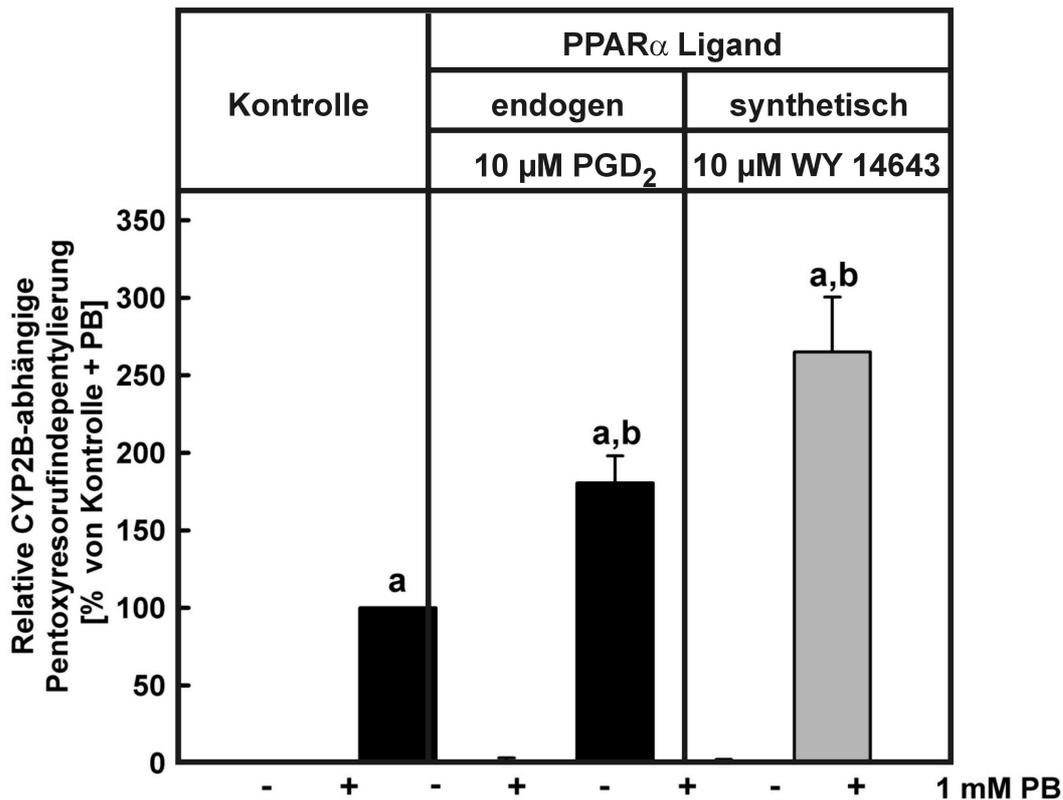


Abb. 31: Der Einfluss von PGD₂ auf die PB-abhängige CYP2B1-Aktivität.

Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter Abb. 30 beschrieben, behandelt. Nach 72 h wurden Mikrosomen präpariert. Die spezifische CYP2B1-katalysierte O-Depentylierung von 7-Pentoxoresorufin zu Resorufin wurde fluorometrisch aufgenommen. Die Aktivität wurde in pmol Resorufin/ mg Protein* min berechnet und dann in Prozent der Kontrolle angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei unabhängigen Experimenten. a = signifikant größer als Kontrolle ($p < 0,05$), b = signifikant größer als Kontrolle + PB ($p < 0,05$), t-test für gepaarte Stichproben.

4.3.3 Der Einfluss von PGD₂ auf die CYP2B1-Promotoraktivität

Hepatozyten, die zuvor mit dem Wildtyppromotorkonstrukt des CYP2B1 (pGL3C2B1) transfiziert worden waren (3.3.3), wurden kultiviert (3.2.4) und nach 48 h mit PGD₂ (10 μ M) behandelt. Die Proben wurden aufgearbeitet (3.8) und die CYP2B1-Promotoraktivität mit Hilfe des Luciferaseassays bestimmt. Die Promotoraktivität in Kontroll-Hepatozyten wurde 100 % gleichgesetzt (Abb. 32). Stimulation mit PB führte zu einer signifikanten Steigerung der Promotoraktivität auf 187 % (Abb. 32). PGD₂ hatte keinen signifikanten Eigeneffekt, steigerte dennoch wie die synthetischen PPAR α -Agonisten die PB-abhängige Promotoraktivität signifikant (Abb. 32).

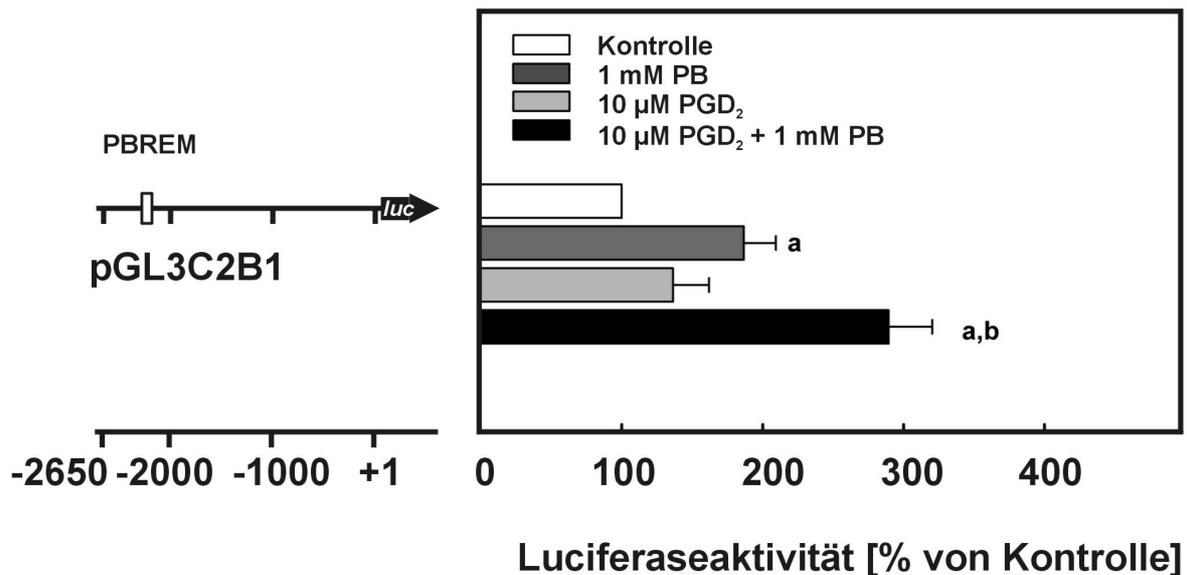


Abb. 32: Der Einfluss von PGD₂ auf die CYP2B1-Promotoraktivität.

Hepatozyten wurden aus der Ratte isoliert (3.1), mit dem Wildtyp-Ratten CYP2B1-Promotor-Reporterkonstrukt pGL3C2B1 transfiziert (3.3.3). Die kultivierte Hepatozyten wurden nach 24 h wie angegeben zur Hälfte mit 1 mM PB und nach 48 h zusätzlich mit 10 µM PGD₂ behandelt (3.2.4). Nach 72 h wurden die Zellen lysiert (Promega Luciferase Assay Kit) und 25 µL Zellysate in den Reporterassay (3.8) eingesetzt. Die relative Luciferaseaktivität verhält sich proportional zur Promotoraktivierung. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. aus drei unabhängigen Experimenten als % von der Kontrolle. a = signifikant größer als Kontrolle ($p < 0,05$), b = signifikant größer als Kontrolle + PB ($p < 0,05$); t-test für gepaarte Stichproben.

4.3.4 Der Einfluss von PGD₂ auf die CAR- und CPT1-Expression

Um zu überprüfen, ob die positive Wirkung von PGD₂ auf die PB-abhängige CYP2B1-Transkription, wie bei den zuvor verwendeten PPAR α -Agonisten auf eine Aktivierung von PPAR α und eine Induktion der CAR-mRNA-Expression zurückzuführen war, wurden die mRNA-Expression des PPAR α -Zielgens Carnityl-Palmityl-Transferase 1 (CPT1) und des CAR-Gens mittels RT-Q-PCR untersucht (3.10). Dazu wurden in Williams E Kulturmedium (ITS) kultivierten Hepatozyten (3.2.4), nach 24 h Kultur zur Hälfte mit 1 mM PB und nach 48 h zusätzlich mit PGD₂ (10 µM) bzw. DMSO (0,1 %) behandelt. Die mRNA-Expression des PPAR α -Zielgens Carnityl-Palmityl-Transferase 1 (CPT1) und des CAR-Gens wurden mittels RT-Q-PCR untersucht (3.10). Die Behandlung mit WY 14643 induzierte die CPT1-Expression sehr stark (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu steigerten weder PGD₂ noch PB allein die CPT1-mRNA-Expression. Die CAR-mRNA-Expression war jedoch, ähnlich den synthetischen PPAR α -Agonisten, nach Behandlung mit PGD₂ signifikant erhöht und wurde bei gleichzeitiger Behandlung mit PB zusätzlich signifikant verstärkt (Abb. 33 und Abb. 18).

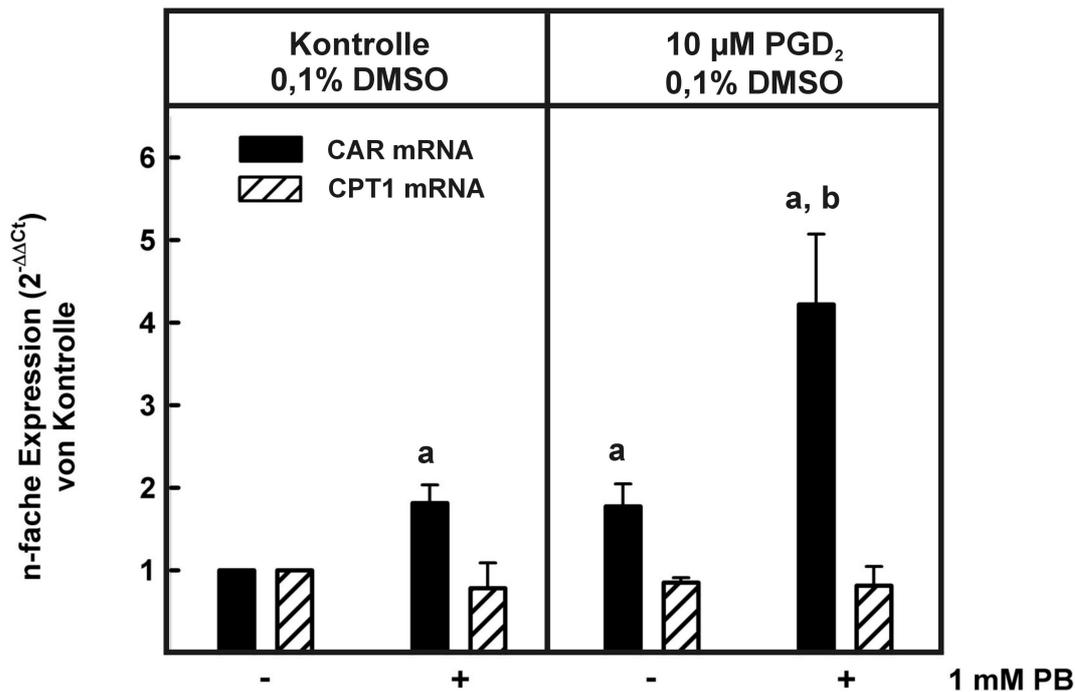


Abb. 33: Der Einfluss von PGD₂ auf die CAR- und CPT1-mRNA-Expression.

Hepatozyten der Ratte wurden für 72 h in Williams-E-Medium kultiviert. Nach 24 h wurden sie wie angegeben zur Hälfte mit 1 mM PB und nach 48 h zusätzlich mit 10 μ M PGD₂ behandelt (3.2.4). RNA wurde mittels Säulenaffinitätschromatographie isoliert und als Matrize für oligo(dT) gestartete cDNA Synthese benutzt. 40 Zyklen der *Real-time* PCR wurde mit spezifischen Oligonucleotiden für Ratten-CAR oder β -Actin durchgeführt (3.10) und der Schwellenzyklus Ct in der logarithmischen Phase der Amplifikation bestimmt. Die Schwellenwerte Ct der β -Actin Proben wurden von den Schwellenwerten der rCAR- bzw. CPT1 Proben subtrahiert (Δ Ct), um das Δ Ct der Kontrolle normalisiert ($\Delta\Delta$ Ct), und als n-fache Expression dargestellt ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Angegeben wurden die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten. a = signifikant größer als Kontrolle ($p < 0,05$), b = signifikant größer als Kontrolle + PB ($p < 0,05$); t-test für gepaarte Stichproben.

4.3.5 Der Einfluss von PGD₂ auf die CAR-Promotoraktivität

Mit Hilfe des Promotorgenkonstrukts unter der Kontrolle von 1,9 kb des Wildtyp-CAR-Promotors wurde trotzdem auch die CAR-Promotoraktivität nach PGD₂-Behandlung untersucht (Abb. 34). Wie zu erwarten wurde die Aktivität des Reportergens in PGD₂-behandelten Hepatozyten im Unterschied zu WY 14643-behandelten Hepatozyten nicht gesteigert (Abb. 23 und Abb. 34). PGD₂ steigerte wie synthetische PPAR α -Agonisten die PB-abhängige CYP2B-Aktivität. Jedoch im Gegensatz zu den synthetischen PPAR α -Agonisten schien diese Induktion jedoch CAR- und wahrscheinlich auch PPAR α -unabhängig zu sein.

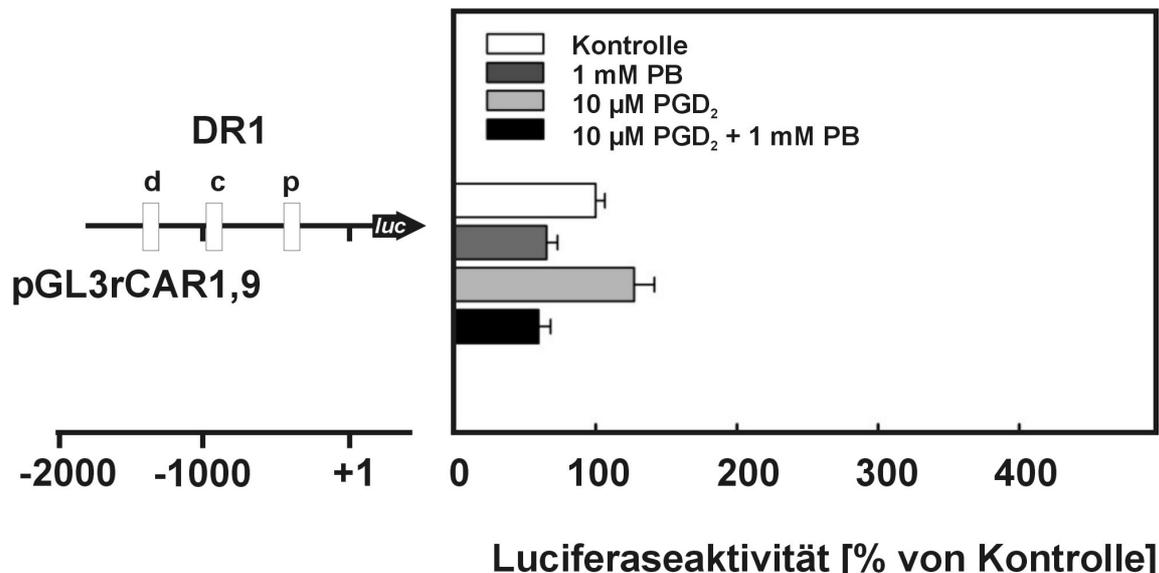


Abb. 34: Der Einfluss von PGD₂ auf die CAR-Promotoraktivität.

Hepatozyten wurden aus der Ratte isoliert (3.1), mit dem Wildtyp-Ratten-CAR-Promotor-Reportergenkonstrukt pGL3rCAR1,9 transfiziert (3.3.3) Kultivierte Hepatozyten der Ratte wurden nach 24 h wie angegeben zum Teil mit 1 mM PB und nach 48 h zusätzlich mit PGD₂ (10 µM) oder DMSO (0,1 %) behandelt. Nach 72 h wurden die Zellen lysiert (Promega Luciferase Assay Kit) und 25 µL Zelllysat in den Reportergen Assay (3.8) eingesetzt. Die relative Luciferaseaktivität verhält sich proportional zur Promotoraktivierung. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. aus zwei unabhängigen Experimenten als % von der Kontrolle.

4.4 Die Steigerung der PB-abhängigen CYP2B-Aktivität in Rattenleber durch *in vivo* Stimulation mit einem PPARα-Agonist

Die primäre Hepatozytenkultur ist ein isoliertes System, mit dem sich nur der Hepatozyt allein betrachten lässt. Wechselwirkungen mit anderen Zellen werden dabei völlig außer Acht gelassen. Um zu beweisen, dass der beobachtete PPARα-Agonisten-Effekt auch im Ganztier von Bedeutung ist, wurden männliche Wistar-Ratten mit PB und WY 14643 oder einer Kombination von beidem behandelt (3.24).

4.4.1 Die Induktion der CYP2B-Aktivität *in vivo* in Abhängigkeit von der Phenobarbitaldosis in Rattenleber

Da die Behandlung der Ratten mit dem PPARα-Agonisten bei der geringsten effektiven PB-Dosis erfolgen sollte, wurde männlichen Wistar-Ratten an drei aufeinanderfolgenden Tagen 0; 0,05; 0,2; 0,78; 3,13; 6,25; 12,5; 25; 50 oder 80 mg PB/ kg Körpermasse in 0,9% NaCl-Lösung i.p. injiziert. Nach Injektion von 50 oder 80 mg PB/ kg Körpermasse schliefen die Tiere zunächst mehrere Stunden. Am vierten Tag wurden die Tiere getötet, die Lebern entnommen, Mikrosomen durch differentielle Zentrifugation präpariert (3.24.3) und die CYP2B-

spezifische 7-Pentoxyresorufindepentylisierung gemessen (3.25.4). Nach Injektion von 0 bis 0,78 mg PB/ kg Körpermasse war keine CYP2B-Aktivität nachweisbar (Abb. 35). Nach Injektion von 3,13 mg PB/ kg Körpermasse konnte eine CYP2B-Aktivität von 9,15 pmol Resorufin/ mg Protein* min gemessen werden. Mit steigender PB-Dosis stieg die CYP2B-Aktivität kontinuierlich an und erreichte ab der Behandlung mit 50 mg PB/ kg Körpermasse den Sättigungsbereich.

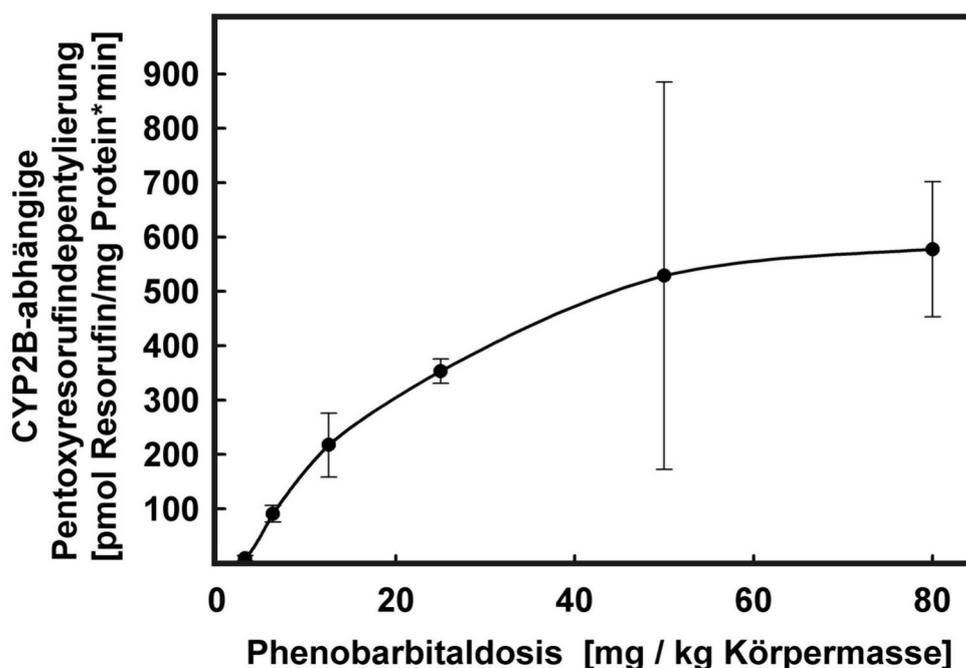


Abb. 35: Die 7-Pentoxyresorufin-O-Depentylierungs-Aktivität des CYP2B1 der Rattenleber in Abhängigkeit von der Phenobarbitaldosis.

Männlichen Wistar Ratten wurde für drei aufeinanderfolgende Tage i.p. PB injiziert (0; 0,05; 0,2; 0,78; 3,13; 6,25; 12,5; 25; 50 oder 80 mg/ kg Körpermasse in 0,9% NaCl-Lösung). Am vierten Tag wurden die Tiere getötet, die Lebern entnommen und Mikrosomen durch differentielle Zentrifugation präpariert (3.24). Die spezifisch durch CYP2B1-katalysierte O-Depentylisierung von 7-Pentoxyresorufin zu Resorufin wurde fluorometrisch (λ_{ex} 530nm; λ_{em} 590nm) aufgenommen (3.6). Die Aktivität wurde in pmol Resorufin/ mg Protein* min berechnet.

4.4.2 Die Induktion der CYP2B-Aktivität *in vivo* durch den PPAR α -Agonisten WY 14643 in Leber der Ratte

Männlichen Wistar Ratten wurde an zwei aufeinanderfolgende Tage i.p. die geringste Dosis PB injiziert, bei der eine Induktion von CYP2B nachweisbar war, (3,13mg/ kg Körpermasse in 0,9% NaCl-Lösung). Die Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen 0,9% NaCl. Am dritten Tag wurde der einen Hälfte der Tiere DMSO (Vehicle) +/- 3,13 mg PB/ kg Körpermasse in 0,9% NaCl (50:50) und der anderen Hälfte 50 mg WY 14643/ kg Körpermasse in DMSO +/- 3,13 mg PB/ kg Körpermasse in 0,9% NaCl (50:50) i.p injiziert. Am vierten Tag wurden die Tiere getötet, die Lebern entnommen und Mikrosomen durch differentielle Zentrifugation präpariert (3.25).

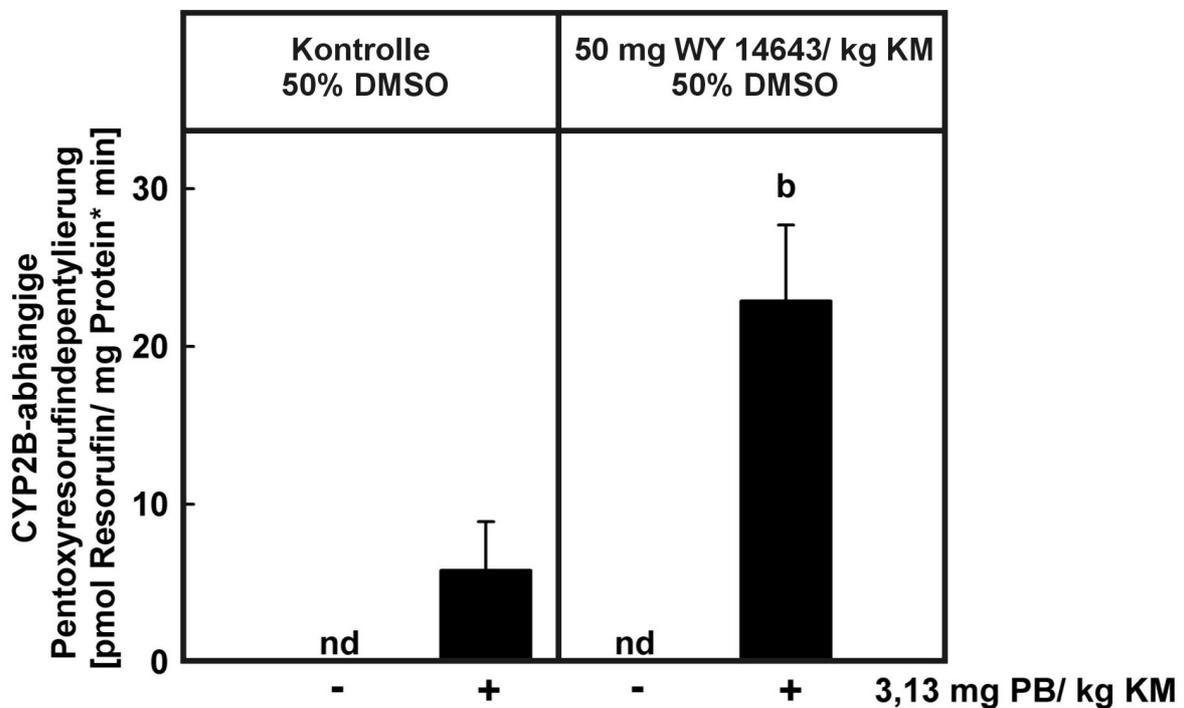


Abb. 36: Die Steigerung der CYP2B1-Aktivität in Rattenleber durch einen PPAR α -Agonisten.

Männlichen Wistar Ratten wurde für zwei aufeinanderfolgende Tage i.p. PB injiziert (3,13mg/ kg Körpermasse in 0,9% NaCl-Lösung), Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen 0,9% NaCl. Am dritten Tag wurde der Hälfte der Tiere DMSO (Vehicle) +/- 3,13 mg PB/ kg Körpermasse in 0,9% NaCl (50:50) und den anderen 50 mg WY 14643/ kg Körpermasse in DMSO +/- 3,13 mg PB/ kg Körpermasse in 0,9% NaCl (50:50) i.p. verabreicht. Am vierten Tag wurden die Tiere getötet, und die Lebern wie in Abb. 35 aufgearbeitet. Die Aktivität wurde in pmol Resorufin/ mg Protein* min berechnet. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm S.E.M. von je drei Tieren. a = signifikant unterschiedlich von Kontrolle ($p < 0,05$), b = signifikant unterschiedlich von Vehicle ($p < 0,05$), nd= nicht detektierbar, t-test für ungepaarte Stichproben.

In Lebermikrosomen von Ratten denen kein PB injiziert wurde, konnte unabhängig von DMSO oder WY 14643 keine CYP2B-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 36). Injektion von 3,13 mg PB/ kg Körpermasse die CYP2B-Aktivität auf 9,15 pmol Resorufin/ mg Protein min (Abb. 35), zusätzliche Injektion von DMSO verringerte die PB-abhängige CYP2B-Aktivität nicht signifikant auf 5,81 pmol Resorufin/ mg Protein* min (Abb. 36). Injektion des PPAR α -Agonisten WY 14643 (50 mg / kg Körpermasse) konnte die PB-abhängige CYP2B-Aktivität auf 22,89 pmol Resorufin/ mg Protein* min erhöhen. PPAR α -Agonisten verstärkten somit auch *in vivo* die PB-abhängige CYP2B-Aktivität (Abb. 36). Die Verringerung der CYP2B-Aktivität durch Injektion von DMSO könnte auf eine leichte Entzündungsantwort zurückzuführen sein, denn das DMSO und das in DMSO gelöste WY 14643 wurden nicht gut von den Tieren vertragen und führte zur Reizung des Bauchraums.

4.4.3 Die Induktion der CAR-Expression *in vivo* durch den PPAR α -Agonisten WY 14643 in Leber der Ratte

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der PPAR α -Agonist WY 14643 die PB-abhängige CYP2B1-Aktivität erhöhte, wurde untersucht, ob diese Beobachtung auch *in vivo* auf eine Verstärkung der CAR-mRNA-Expression zurückzuführen ist. Dafür wurde aus Teilen der Leber derselben Ratten Gesamt-RNA isoliert (3.11.2), in cDNA umgeschrieben und in eine RT-Q-PCR eingesetzt (3.10). Injektion von PB (3,13 mg/ kg Körpermasse) veränderte die CAR-mRNA-Expression nicht (Abb. 37). Injektion von WY 14643 (50 mg/ kg Körpermasse) steigerte die CAR-mRNA-Expression signifikant auf das 1,5 fache (Abb. 37). In Verbindung mit PB konnte WY die CAR-mRNA-Expression nicht signifikant steigern.

4.4.4 Die Induktion der CAR-Expression *in vivo* durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren

Als synthetischer PPAR α -Ligand erhöhte WY 14643 die CAR-mRNA-Expression *in vivo*. Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob einfach und mehrfach ungesättigte Fettsäuren in der Nahrung einen ähnlich positiven Einfluss auf die CAR-mRNA-Expression besitzen. Dazu wurden jeweils 3 männlichen Ratten (KG 300g) an fünf aufeinanderfolgenden Tagen immer nachmittags 2 mL Olivenöl (72% Ölsäure; 0,7 % ω -3 Fettsäuren) oder Fischöl (25% ω -3 Fettsäuren) per Schlundsonde zugeführt. Kontrolltiere erhielten keine Schlundsonde. Dann wurden die Lebern mit physiologischer Kochsalz-Lösung blutleer gespült, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert. Aus Teilen der Lebern wurde RNA gewonnen und in cDNA transkribiert und in die RT-Q-PCR eingesetzt. Fischöl verdoppelte signifikant die CAR-mRNA Expression verglichen mit Kontrolltieren (Abb. 38).

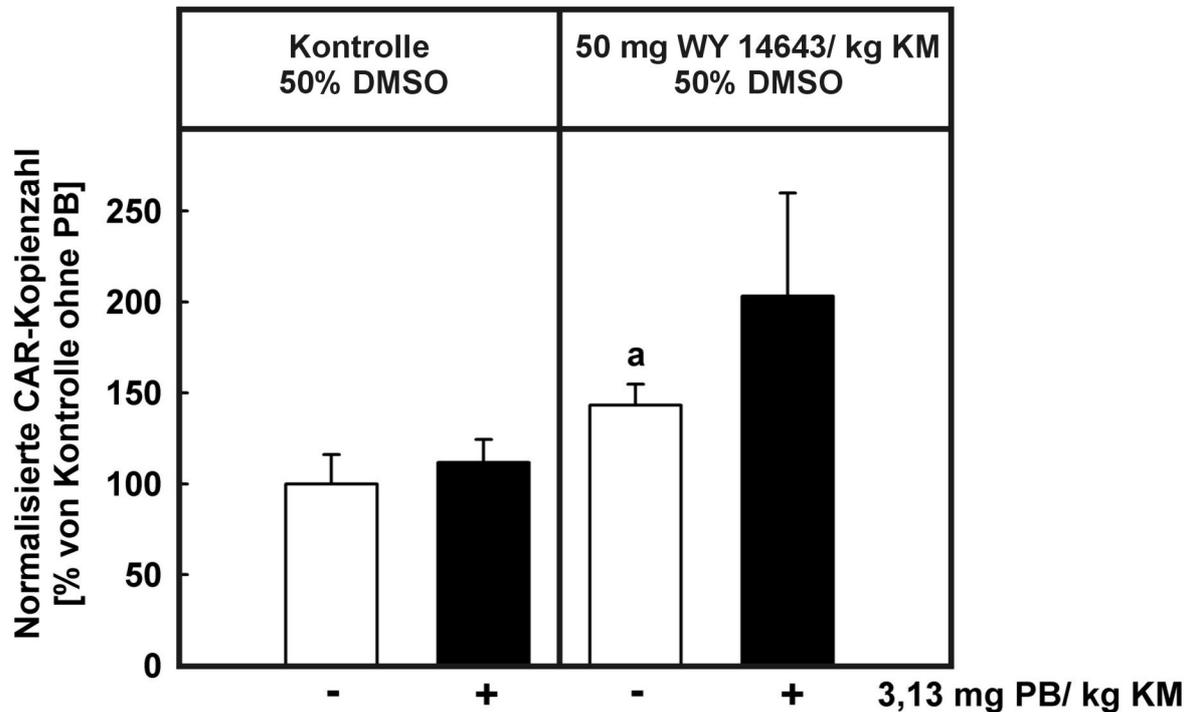


Abb. 37: Die Steigerung der CAR-Expression in Rattenleber durch einen PPAR α -Agonisten.

Männlichen Wistar Ratten wurde wie in Abb. 36 beschrieben behandelt. Aus den Lebern wurde gesamte RNA mittels Säulenaffinitätschromatographie isoliert und als Matrize für oligo(dT) spezifische cDNA Synthese benutzt. 40 Zyklen der Real-time PCR wurde mit spezifischen Primer für Ratten CAR oder β -Actin durchgeführt (3.10) Die amplifizierte cDNA wurde anhand des Zyklus bestimmt, bei dem das Fluoreszenzsignal größer als ein definierter Schwellenwert in der logarithmischen Phase der Amplifikation war. Mittels spezifischer Standardreihen für rCAR oder β -Actin wurde die tatsächliche Kopienzahl bestimmt. Die Daten rCAR Kopienzahl wurde normalisiert um die β -Actin-Kopienzahl. Die Ergebnisse sind dargestellt in % von der Kontrolle. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm S.E.M. von zwei (DMSO) bis drei (WY 14643) Tieren. a = signifikant unterschiedlich von Kontrolle ($p < 0,05$), t-test für ungepaarte Stichproben.

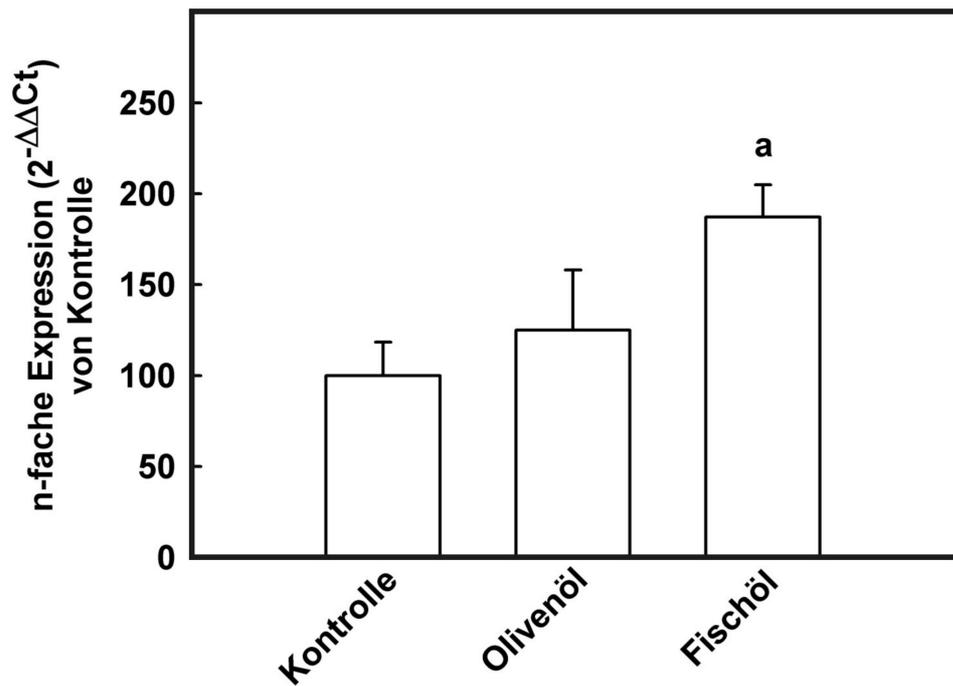


Abb. 38: Die Steigerung der CAR-Expression in Rattenleber durch Fettsäuren.

Jeweils 3 männlichen Ratten (KG 300g) wurden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen nachmittags 2 mL Olivenöl (72% Ölsäure; 0,7 % ω -3 Fettsäuren) oder Fischöl (25% ω -3 Fettsäuren) per Schlundsonde zugeführt. Kontrolltiere erhielten keine Schlundsonde. Die Ratten hatten nachts freien und tagsüber bis zur Applikation keinen Zugang zu Futter. Dann wurden die Lebern mit physiologischer Kochsalz-Lösung blutleer gespült, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert. Aus den Lebern wurde RNA mittels Säulenaffinitätschromatographie isoliert und in cDNA umgeschrieben. 40 Zyklen der Real-time PCR wurde mit spezifischen Oligonucleotiden für Ratten-CAR oder β -Actin durchgeführt (3.10) und der Schwellenzyklus Ct in der logarithmischen Phase der Amplifikation bestimmt. Die Schwellenwerte Ct der β -Actin Proben wurden von den Schwellenwerten der rCAR-Proben subtrahiert (Δ Ct), um das Δ Ct der Kontrolle normalisiert ($\Delta\Delta$ Ct), und als n-fache Expression dargestellt ($2^{-\Delta\Delta$ Ct}). Angegeben wurden die Mittelwerte \pm S.E.M. von drei unabhängigen Experimenten. a = signifikant größer als Kontrolle ($p < 0,05$), t-test für ungepaarte Stichproben

5 DISKUSSION

5.1 Die PPAR α -Agonisten-vermittelte Expression von CAR

In der Leber wird die Expression einer Vielzahl von Genen, die am Fremdstoffmetabolismus und am Abbau Energiestoffwechsel-regulierender Hormone beteiligt sind, durch den nukleären Rezeptor Constitutiver-Androstane-Rezeptor (CAR) reguliert. Der nukleäre Rezeptor Peroxisomenproliferator-aktivierter-Rezeptor- α (PPAR α) wiederum induziert die Expression von Genen, die Schlüsselenzyme des Fettsäureabbaus, der Ketogenese und der Gluconeogenese darstellen. In primär kultivierten Hepatozyten der Ratte steigerte die Behandlung mit PPAR α -Agonisten die CAR-Protein- und -mRNA-Expression (Abb. 18 und Abb. 19) sowie die Transkription eines Reportergens unter der Kontrolle von bis zu 4,4 kb des CAR-Promotors der Ratte (Abb. 20). Auch in der Leber von PPAR α -Agonist-behandelten Ratten konnte eine gesteigerte CAR-mRNA-Expression beobachtet werden (Abb. 37). Diese PPAR α -Agonisten-vermittelt gesteigerte CAR-Expression spiegelte sich *in vitro* und *in vivo* in einer Verstärkung der PB-abhängigen Expression des CAR-Zielgens CYP2B1 wider (Abb. 10, Abb. 11, Abb. 12 und Abb. 36).

5.1.1 Die Ursachen der PPAR α -Agonisten-vermittelten Steigerung der CAR-Expression

Die PPAR α -abhängige CAR-Transkription. Reporter-genkonstrukte unter der Kontrolle von 1,9 kb des CAR-Promotors der Ratte, in denen mutmaßliche PPAR α -Bindestellen mutiert waren, zeigten, dass ein zentrales DR1-Motiv im Bereich von -942 bp bis -930 bp des CAR-Promotors essentiell für die Aktivierung der Transkription des Reportergens durch PPAR α -Agonisten ist (Abb. 20, Abb. 22 und Abb. 23). Daher sollte der Nachweis geführt werden, dass PPAR α direkt an dieses DR1-Motiv bindet. In *bandshift*-Experimenten mit radioaktiv markiertem zentralen DR1-Motiv (Oligonukleotid), Hepatozytenkernextrakten und den einzelnen unmarkierten Reporter-genkonstrukten konnte gezeigt werden, dass der beobachtete *band shift* nicht mehr durch molaren Überschuß an unmarkiertem CAR-Promotorgenkonstrukt kompetitiert werden konnte, wenn das zentrale PPAR α -Bindemotiv deletiert war (Abb. 24). Nach Überexpression von PPAR α konnte in *bandshift*-Experimenten eine verstärkte Akkumulation von Kernprotein mit dem zentralen DR1-Motiv des CAR-Promotors beobachtet werden. (Wieneke, *et al.* 2007). Zuvor hatten auch Kocarek *et al.* nach Überexpression von PPAR α eine gesteigerte PB-abhängige CYP2B1-Promotor-Reporter-genaktivität festgestellt, die wiederum durch Transfektion mit dominant negativem PPAR α -Rezeptor gehemmt werden konnte (Kocarek, *et al.* 2002). Zusammen mit den

Ergebnissen der Chromatin-Immünpräzipitationen (Abb. 25) deutet dies darauf hin, dass aktiviertes PPAR α :RXR α -Heterodimer über die Bindung an das zentrale DR1-Motiv des CAR-Promotors (-942 bp bis -930 bp) die CAR-Transkription in Ratten induziert.

Die CAR-Expression in PPAR α (-/-)-Mäusen. Wenn PPAR α die CAR-Expression reguliert, wäre zu erwarten, dass PPAR(-/-)-Mäuse eine erniedrigte CAR-Expression aufweisen. Obwohl kein Unterschied in der basalen CAR-mRNA-Expression der Leber zwischen Wildtyp-Sv/129-Mäusen und PPAR α (-/-)-Sv/129-Mäusen festgestellt werden konnte, reagierten nur Wildtyp-Sv/129-Mäusen auf Fasten mit einer erhöhten CAR-mRNA-Expression (Wieneke, *et al.* 2007). Diese Beobachtung untermauert die Bedeutung von PPAR α für die Fasten-abhängige CAR-Expression. Allerdings beobachteten Martin, *et al.* in ihren PPAR α (-/-)-C57BL/6J-Mäusen bereits basal, eine erhöhte CAR-Expression, die demzufolge PPAR α -unabhängig war (Martin, *et al.* 2007). Die verschiedenen genetischen Hintergründe der Mausstämmen sind möglicherweise die Ursache dieser konträren Beobachtungen. In beiden PPAR α (-/-)-Mausstämmen ist der Fettsäureabbau und die Lipoproteinsynthese gestört, so dass die Mäuse mit der Zeit an Steatosis leiden (Akiyama, *et al.* 2001, Hashimoto, *et al.* 2000, Kersten, *et al.* 1999). Doch während sich in PPAR α (-/-)-Sv/129-Mäusen mit dem Alter der Cholesterolgehalt erhöhte, wiesen gleichaltrige PPAR α (-/-)-C57BL/6J-Mäuse einen erhöhten Triacylglycerolgehalt auf (Akiyama, *et al.* 2001). Es wäre daher interessant, die Phäno- und Genotypen beider Mausstämmen und PPAR α (-/-)-Modelle unter verschiedenen Bedingungen genauer zu analysieren. Da Ding *et al.* ein funktionelles HNF4 α -responsives Element im proximalen murinen CAR-Promotor identifizierten, könnte eine vermehrte Aktivierung von HNF4 α zu der beobachteten erhöhten, basalen CAR-Expression in dem einen Mausmodell beitragen (Ding, *et al.* 2006). Anhand weiterer HNF4 α -Zielgene, ließe sich feststellen, ob HNF4 α in diesem Stamm tatsächlich aktiver ist.

Die HNF4 α -abhängige, cAMP-vermittelte CAR-Transkription. Da Nahrungskarenz CAR und CAR-Zielgene induzierte (M. Bauer, *et al.* 2004, Goodwin und Moore 2004, Maglich, *et al.* 2004, Qatanani, *et al.* 2005), vermuteten Ding *et al.*, dass dabei die HNF4 α -abhängige Transkription von CAR beeinflusst wird. Über einen Anstieg von cAMP, wie er z.B. durch Glucagon oder Adrenalin entsteht, wurde cAMP-responsives-Element-Bindeprotein-(CREB)-abhängig der PPAR γ -Coaktivator-1 α (PGC1 α) exprimiert, der dann wiederum HNF4 α als Cofaktor bei der Steigerung der CAR-Transkription dienen könnte (Ding, *et al.* 2006). Ein homologes CAR-Promotorkonstrukt der Ratte konnte unter unseren Versuchsbedingungen jedoch nicht mit Adrenalin aktiviert werden (Abb. 26). Ebenso wenig wurde ein Anstieg der CAR-mRNA nachgewiesen (Abb. 27). Adrenalin hemmte im Gegenteil sogar die WY 14643 vermittelte Steigerung der CAR-mRNA-Expression (Abb. 27). Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass Adrenalin neben β -adrenergen Gs-gekoppelten Rezeptoren auch α -adrenerge

Gq-gekoppelte Rezeptoren aktiviert (Fagan und Romani 2000). In weiterführenden Experimenten wurden Hepatozyten daher mit Glucagon oder Isopretenol (β -adrenerger-Rezeptor-Agonist), die spezifisch Gs-gekoppelte Rezeptoren aktivieren, behandelt. Auch diese beiden Substanzen konnten die CAR-Transkription nicht steigern (nicht gezeigt). Unterschiede bei den Zellkulturbedingungen und den Spezies können als Ursache für den beobachteten negativen Effekt von Adrenalin, Glucagon oder Isopretenol nicht ausgeschlossen werden. Ein intrazellulärer Anstieg von cAMP führte in den vorliegenden Experimenten nicht zu einer Transkription von CAR.

Die CAR-Expression in HNF4 α -(-/-)-Mäusen. Jover *et al.* und Kamiyama *et al.* konnten keine vollständige Inhibition der Expression von CAR und humanen CAR-Zielgenen nach Transfektion mit einem HNF4 α -Antisense-RNA-Expressionsvektors feststellen (Jover, *et al.* 2001, Kamiyama, *et al.* 2007). Bei adulten Mäusen, die in der Leber kein HNF4 α exprimierten, war die basale CAR-mRNA-Expression erniedrigt. Fasten führte bei diesen Mäusen dennoch zu einem Anstieg der CAR-mRNA-Expression (Ding, *et al.* 2006, Tirona, *et al.* 2003).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die Versuche mit den genannten Knock-out-Modellen deuten an, dass die basale CAR-Expression und die fastenabhängige CAR-Expression auf unterschiedlichen Wegen reguliert werden. Für die Aufrechterhaltung der basalen CAR-Expression scheint der NR HNF4 α von entscheidender, der NR PPAR α hingegen von geringer Bedeutung zu sein. PPAR α könnte indessen bei der fastenabhängigen CAR-Expression eine tragende Rolle zukommen.

5.1.2 Die Folgen einer PPAR α -abhängigen CAR-Transkription für die Expression von CAR-Zielgenen

Die CAR-abhängige Transkription von CYP2B1. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die CAR-Expression in männlichen Wistar-Ratten durch Behandlung mit PPAR α -Agonisten - womöglich über einen PPAR α -abhängigen Mechanismus - induziert werden konnte, wurde auch die Expression des CAR-Zielgens CYP2B1 in den Hepatozyten untersucht. Obwohl es in der Literatur vereinzelt Hinweise darauf gibt, dass der Spiegel freier Fettsäuren die Expression von CYP2B-Genen beeinflussen kann (Brown, *et al.* 1995), induzierte Behandlung mit PPAR α -Agonisten allein in dieser Arbeit wider Erwarten das CAR-Zielgen CYP2B1 nicht (Abb. 10, Abb. 11 und Abb. 12). Allerdings wurde die PB-abhängige Induktion der CYP2B-Expression und -Aktivität durch die PPAR α -Agonisten signifikant dosis- und zeitabhängig verstärkt (Abb. 10 - Abb. 15). Anschließende Transfektionsexperimente mit Reportergenkonstrukten unter der Kontrolle von 2650 bp des Wildtyp-CYP2B1-Promotors der Ratte oder daraus hergestellten sukzessiven Deletionskonstrukten zeigten, dass die Behandlung mit PPAR α -Agonisten die PB-abhängige Induktion der Reportergenaktivität steigerte (Abb. 17).

Diese PPAR α -Agonisten-vermittelte Steigerung der PB-abhängigen Reporterogenaktivität fehlte nur in dem PBREM-Deletionskonstrukt (pGL3CD8). Sie war folglich PBREM-anhängig (-2626 bis -2156 bp). Diese PBREM-abhängige Wirkung der PPAR α -Agonisten steht im Einklang mit der Beobachtung, dass PPAR α -Agonisten CAR induzieren. Die für die Aktivierung von CAR nötigen Zwischenschritte, wie die CAR-Translokation in den Zellkern, die Dimerisierung und vor allem die Rekrutierung von Coaktivatoren an das RXR α :CAR-Heterodimer erfolgen PB-abhängig und führen letztendlich zur Initiation der CYP2B1-Transkription am PBREM (Abb. 39)(Honkakoski, *et al.* 1998, Kawamoto, *et al.* 1999).

Die CAR-unabhängige Transkription von CYP2B1. Überraschenderweise induzierten die PPAR α -Agonisten auch allein, PB-unabhängig und PBREM-unabhängig, die Transkription des Reportergens (Abb. 17), führte jedoch nicht zu einer Zunahme der CYP2B1-mRNA (Abb. 10). Diese PB-unabhängige Aktivierung, nicht aber die PPAR α -Agonisten-vermittelte Steigerung der PB-abhängige Transkription des Reportergen, fehlte in allen Konstrukten, bei denen der Bereich von -236 bis -176 bp des proximalen CYP2B1-Promotors deletiert war (Abb. 28). In diesem proximalen Promotorbereich konnte mittels Computeranalyse ein ER4-Motiv als potentielle Bindestelle für Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Die Einführung von Punktmutationen zerstörte das ER4-Motiv, hemmte jedoch nicht die PB-unabhängige PPAR α -Agonisten-vermittelte Aktivierung des Reportergens (Abb. 28). Auf weitere Untersuchung dieses Promotorabschnitts wurde zunächst verzichtet, da diese PB-unabhängige PPAR α -Agonisten-vermittelte Aktivierung vermutlich nicht zu der Steigerung der PB-abhängigen Aktivierung des CYP2B1-Promotors beitrug (Abb. 28). Außerdem wurde PB-unabhängig keine CYP2B1-mRNA exprimiert (Abb. 10). Möglicherweise fehlten für die Expression und Aktivierung von CYP2B1 notwendige Co-Aktivatoren. Zudem ist bekannt, dass PB in der Lage ist, RNA zu stabilisieren. Es könnte daher im Gegensatz zu PPAR α -Agonisten auch posttranskriptionell die Expression von CAR und CAR-Zielgenen fördern (Aida und Negishi 1991, Matsumura und Omura 1973)

Die Expression weiterer CAR-Zielgene. Zurzeit wird die Expression weiterer CAR-Zielgene, vor allem der Phase-II des Fremdstoffmetabolismus, untersucht. Vorläufige Ergebnisse deuten darauf hin, dass die PPAR α -Agonisten, obwohl sie die CAR-Expression fördern, die PB-abhängige Expression von CAR-Zielgenen sowohl positiv- wie im Falle des CYP2B1- als auch negativ beeinflussen können (nicht gezeigt). Für die Expression von CAR-Zielgenen sind nicht nur die CAR-Transkription sondern auch die mRNA-Stabilität, der ungestörte Ablauf von Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozessen bei der CAR-Translokation, der Aufbau der responsiven Promotorelemente sowie die Verfügbarkeit von Co-Faktoren, Dimerisierungspartnern und Liganden von Bedeutung.

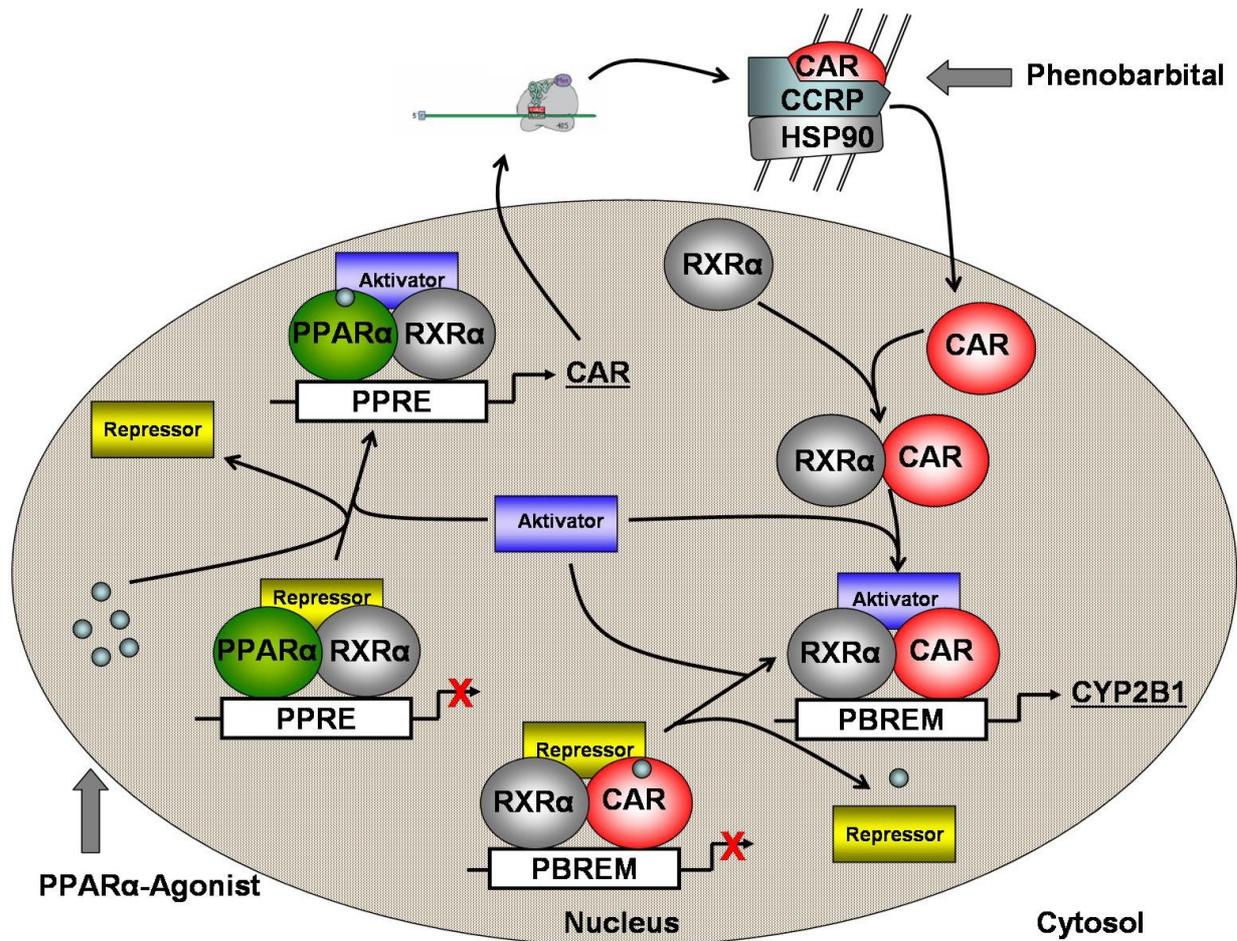


Abb. 39: Mögliches Schema der PPAR α -Agonisten-vermittelten Induktion von CAR am Beispiel des CAR-Zielgens CYP2B1.

PPAR α -Agonisten binden im Zellkern an die PPAR α -LBD des nukleären Rezeptorheterodimers PPAR α :RXR α . Durch Konformationsänderung von Helix 12 kommt es zum Austausch von Corepressoren durch Coaktivatoren, z.B. PBP, und damit zur Rekrutierung des Polymerase II Transkriptions-Komplexes und Initiierung der CAR-Transkription und Expression. Möglicherweise fördern PPAR α -Agonisten auch die CAR-Translokation, aber auch als inverse Agonisten die Rekrutierung von Corepressoren. Gleichzeitige Stimulation der Hepatozyten mit Phenobarbital führte zu einer Aktivierung von CAR, mutmaßlich durch eine vermehrte, phosphorylierungssensitive Translokation in den Nucleus und dortige dephosphorylierungssensitive Aktivierung. Im Nucleus bilden sich RXR α :CAR-Heterodimere. PB-abhängig werden zum Teil im Austausch mit Corepressoren, Coaktivatoren wie PBP und GRIP-1 rekrutiert. An PB-responsive Elemente, wie das DR4-Motiv im distalen CYP2B1-Promotor, gebundene RXR α :CAR-Heterodimere aktivieren dann die Transkription von CYP2B1.

5.1.3 Die Beeinflussung der CAR-Aktivität und CYP2B1-Expression unabhängig von der CAR-Expression

Die Beeinflussung der CAR-Aktivität unabhängig von der CAR-Expression. Guo *et al.* konnten zeigen, dass CAR sowohl nach Behandlung mit PB als auch PPAR α -Agonisten unter Beteiligung des Cofaktor PBP in den Zellkern transloziert (Guo, *et al.* 2007). In Einklang mit

dieser Beobachtung konnte die Bindung von Kernproteinen an das NR1-Motiv des CYP2B1-PBREM nicht nur durch PB sondern auch durch PPAR α -Agonisten verstärkt werden (nicht gezeigt). Dennoch induzierte einzig die Behandlung mit PB, nicht aber mit PPAR α -Agonisten, die Expression von CAR-Zielgenen (Abb. 10, Abb. 11 und Abb. 12) (Guo, *et al.* 2007). Guo *et al.* postulierten, dass PPAR α -Agonisten im Gegensatz zu PB, welches Cofaktoren rekrutiert, selbst als inverse Agonisten in die LBP von CAR binden, Corepressoren rekrutieren und damit die CAR-Aktivität und die Expression von CAR-Zielgenen hemmen (Guo, *et al.* 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde die maximale Verstärkung der PB-abhängigen CYP2B1-Aktivität durch WY 14643 und GW 7647 bereits bei einer Konzentration von 1 μ M erreicht und konnte durch die 10-fache Menge nicht weiter gesteigert werden (Abb. 14). Bei diesen Konzentrationen konnten auch Guo *et al.* noch keine Hemmung der PB-abhängigen Cofaktorrekutierung durch PPAR α -Agonisten feststellen (Guo, *et al.* 2007). Noch höhere Konzentrationen an WY 14643 (*in vivo* 250 mg/ kg KM, *in vitro* sogar bis zu 1 mM), wie sie in den Versuchen von Guo *et al.* verwendet wurden, führen, anders als geringere Dosen, nicht zu einer Verstärkung der PB-abhängigen Expression von CAR-Zielgenen, sondern zu einer Hemmung derselben (Guo, *et al.* 2007). Tierversuche mit PB und ansteigenden Dosen PPAR α -Agonisten könnten zeigen, ob PPAR α -Agonisten CAR-Zielgene tatsächlich bei niedrigen Dosen induzieren und bei hohen Dosen reprimieren.

Die Beeinflussung der CYP2B1-Aktivität unabhängig von der CAR-Expression. PB-unabhängig wurde PPAR α -Agonisten-vermittelt keine CYP2B1-mRNA exprimiert, obwohl die Transkription eines Reportergens unter der Kontrolle von -2650 bp des CYP2B1-Promotors aktiviert wurde. Da PB stabilisierend auf mRNA wirkte, könnte es, wie bereits erwähnt, im Gegensatz zu PPAR α -Agonisten auch posttranskriptionell die Expression von CAR und CAR-Zielgenen fördern (Aida und Negishi 1991, Matsumura und Omura 1973). Außerdem ist CYP2B1 ein Hämoprotein. Somit ist auch die Bereitstellung von Häm neben dem Apocytochrom limitierend für den Aufbau des aktiven CYP2B1-Holocytochromes. Das Schlüsselenzym der Hämbiosynthese in Hepatozyten repräsentiert die ubiquitär exprimierte ALAS-1. Sie wird durch Fremdstoffe induziert und durch freies Häm gehemmt, und sichert die adequate Bereitstellung der prosthetischen Gruppe für das Holocytochrom (Fraser, *et al.* 2003). Darüber, ob PB die ALAS-1 CAR-abhängig oder CAR-unabhängig induziert, gibt es widersprüchliche Aussagen (Fraser, *et al.* 2003, Roberts und Elder 2001, Sinclair, *et al.* 1990, Varone, *et al.* 1999). Da von PPAR α -Agonisten weder bekannt ist, dass sie die RNA stabilisieren noch, dass sie die ALAS-1 induzieren, könnte nur bei gleichzeitiger Behandlung mit PB neben der CAR-abhängigen Induktion von CYP2B, eine CAR-unabhängig Stabilisierung der mRNA die CYP2B1-Expression und durch Bereitstellung von Häm die CYP2B-Aktivität fördern.

5.1.4 Die Bedeutung von PGD₂ als Verstärker der PB-abhängigen Expression von CAR-Zielgenen

Die Hepatozyten stehen in engem Kontakt mit leberspezifischen residenten Makrophagen, den Kupfferzellen. Diese produzieren auf einen exogenen Reiz, wie z.B. LPS, hin vermehrt Prostaglandine, hauptsächlich PGD₂ (Decker 1990). Auch PB-Behandlung führt in Kupfferzellen zur Induktion der COX-2-mRNA-Expression und vermehrter Ausschüttung von PGD₂ (Kroll, et al. 1999), welches dann über den organische Anionen-Transporter PGT in die Hepatozyten aufgenommen werden kann (Lu, et al. 1996). PGD₂ ist ein PPAR α -Agonist. (Corton, et al. 2000, Forman, et al. 1997, Kliewer, et al. 1997). Die PB-abhängige Ausschüttung von PGD₂ aus Kupfferzellen könnte *in vivo* über eine PPAR α -abhängige Induktion von CAR zu der PB-abhängigen Expression von CAR-Zielgenen wie CYP2B1 beitragen.

Die Behandlung mit PGD₂ steigerte, ähnlich den PPAR α -Agonisten, die PB-abhängige CYP2B1-Aktivität (Abb. 30), Protein-Expression (Abb. 31) und CYP2B1-Promotoraktivität (Abb. 32). Im Unterschied zu den PPAR α -Agonisten (nicht gezeigt) waren weder die CAR-mRNA-Expression noch die mRNA-Expression des PPAR α -Zielgens CPT1 in PGD₂-behandelten Hepatozyten gesteigert (Abb. 33). Auch ein Reporter gen unter der Kontrolle von 1,9 kb des Wildtyp-CAR-Promotors der Ratte konnte durch PGD₂ nicht aktiviert werden (Abb. 34). Der Mechanismus der Induktion der CAR-mRNA-Expression schien zum einen PPAR α unabhängig zu sein und zum anderen nicht auf einer gesteigerten CAR-mRNA-Expressionsrate zu beruhen. Hepatozyten besitzen neben dem PGT auch heptahelikale transmembrane Prostaglandin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Den DP-Rezeptor an den PGD₂ hauptsächlich bindet, exprimieren sie allerdings kaum (Fennekohl, et al. 1999). PGD₂ bindet auch an den Gq-gekoppelten FP-Rezeptor der durch Aktivierung der Phospholipase C den second messenger Inositoltrisphosphat freisetzt und damit die intrazelluläre Kalzium-Konzentration (Freisetzung aus dem ER) erhöht. Da die Hemmung von Ca²⁺/ Calmodulin-Kinasen die Aktivierung von CAR-Zielgenen im Zellkern senkte (Maglich, et al. 2002, Marc, et al. 2000, Ueda, et al. 2002a), wäre es möglich, dass Aktivierung dieser Kinasen durch intrazellulären Kalzium-Anstieg die Expression von CAR-Zielgenen verbessern würde. In weiterführenden Versuchen konnte allerdings gezeigt werden, dass der eigentliche FP-Rezeptor-Ligand PGF_{2 α} die PB-abhängige Transkription von CAR-Zielgenen nicht förderte (nicht gezeigt).

5.2 Die Bedeutung einer PPAR α -abhängigen Induktion von CAR bei der Anpassung des Stoffwechsels an Nahrungskarenz

5.2.1 Die Bedeutung von PPAR α

Bei andauernder Nahrungskarenz ist eine schnelle Anpassung des Intermediärstoffwechsels der Leber lebensnotwendig. Die Hauptenergielieferanten im Fasten sind Triacylglycerole. Sie werden in der Lipolyse zu Glycerol und Fettsäuren abgebaut. Die Fettsäuren werden im Fettgewebe durch die hormonsensitive Lipase freigesetzt, zur Leber transportiert, mit CoA aktiviert (LCAS), in die Mitochondrienmatrix transportiert (CPT I und II) und in der β -Oxidation in Acetyl-CoA-Reste aufgespalten (MCAD). Acetyl-CoA wird dann entweder in den Citratzyklus eingeschleust oder in Ketonkörper umgewandelt (HMG-CoAS), die die Energiezufuhr im ZNS sichern (Abb. 40). Sehr lange Fettsäuren werden vor ihrem Abbau in der mitochondrialen β -Oxidation in den Peroxisomen β -oxidiert (ACO, BIEN). Zusätzlich induziert PPAR α die mikrosomale ω -Oxidation von Fettsäuren (CYP4A1). Die Glycogenolyse,

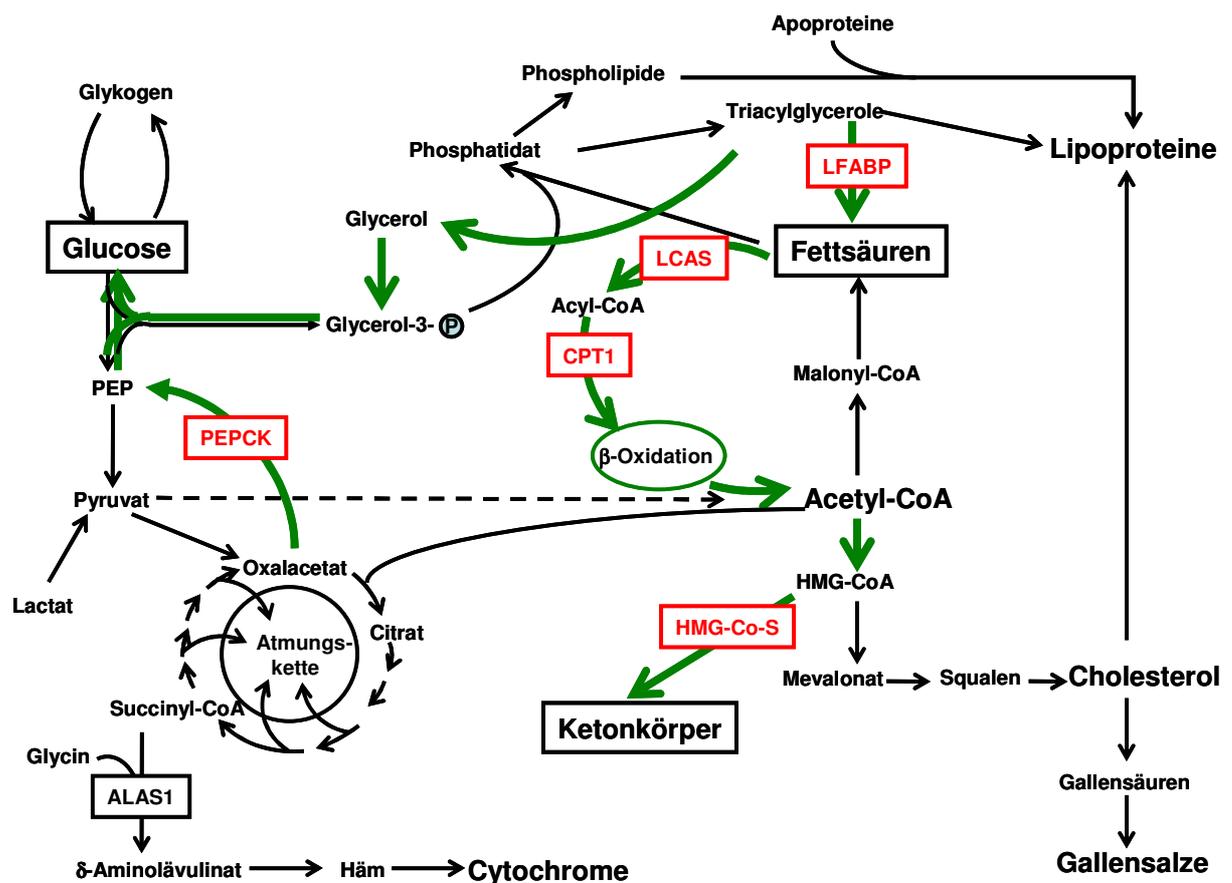


Abb. 40: Vereinfachtes Schema des Substratflusses in der Leber bei Nahrungskarenz

Glucose und Fettsäuren sind die wichtigsten Energielieferanten des Körpers. Die Leber sichert die Bereitstellung für periphere Zellen. Die von PPAR α aktivierten Stoffwechselwege des Fettsäure-Katabolismus und der Gluconeogenese sind grün hervorgehoben und einige Zielgene rot markiert.

aber vor allem die Gluconeogenese aus Glycerol, glucogenen Aminosäuren und Lactat stellt das Mindestmaß an Glucose für obligate Glucoseverwerter, wie Erythrocyten, Nervenzellen oder das Nierenmark bereit. PPAR α kontrolliert über die Induktion der in Klammern angegebenen Enzyme die Energiebereitstellung aus Fettsäuren (M. Bauer, et al. 2004, Corton, et al. 2004, Ferre 2004, Kersten, et al. 1999, Kroetz, et al. 1998, Mandard, et al. 2004). Auch die Gluconeogenese wird durch PPAR α gefördert. Im Promotor der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, die dem Citratzyklus Oxalacetat entzieht und es zu Phosphoenolpyruvat umwandelt (Abb. 40), wurde ein funktionales PPRE (DR1-Motiv) entdeckt (Scribner, et al. 2007). PPAR α -(-/-)-Mäuse sind stark hypoglykämisch. Sie oxidieren in extrahepatischem Gewebe vermehrt Glucose, da sie aufgrund einer gestörten β -Oxidation nicht auf Fettsäuren als Energielieferant zurückgreifen können. Ferner ist bei ihnen die hepatische Gluconeogenese vermindert. Neben PPAR α hemmt auch die AMP-Kinase, die durch das bei Nahrungskarenz ansteigende Verhältnis von AMP zu ATP aktiviert wird, die hepatische Glykogenproduktion und Lipidsynthese und fördert die Fettsäureoxidation (Foretz, et al. 2005, Kahn, et al. 2005). Rencurel et al. zeigten, dass auch die AMP-Kinase für die Expression von CAR-Zielgenen wie CYP2B von Bedeutung sein könnte (Rencurel, et al. 2006).

Die Regulation der PPAR α -Aktivität. Neben PPAR α :RXR α -Heterodimeren bevorzugen auch RXR α :LXR α -Heterodimere sowie HNF4 α - und RXR α -Homodimere DR1-Motive. Die jeweilige Affinität zu einem DR1-Motiv wird durch den 5'- oder 3'-Bereich des responsiven Elements definiert. Die Bindung eines Rezeptordimers führt dann je nach Bindeelement zur Aktivierung oder Repression des betreffenden Gens. So ist z.B., bekannt, dass PPRE durch RXR α :LXR α -Heterodimere und LXR-responsive Elemente durch PPAR α :RXR α -Heterodimere blockiert werden können (Adamson, et al. 2006, Ijpenberg, et al. 1997, Yoshikawa, et al. 2003). PPAR α wird wie HNF4 α durch Fettsäurethioester (endogener oder exogener Ursprung) aber auch Fibrate aktiviert (Schroeder, et al. 2005). Der Sättigungs- und Verzweigungsgrad der Fettsäure ist dabei entscheidend für die Initiation oder Repression der Rezeptoraktivität. Ungesättigte Fettsäurethioester (FS-CoA) aktivieren PPAR α und hemmen als inverse Agonisten die HNF4 α -Aktivität und damit die Expression von HNF4 α -regulierten Genen wie der Pyruvat-Kinase oder Fettsäure-Synthase (Adamson, et al. 2006, Hertz, et al. 2001, Hertz, et al. 2005, Hostetler, et al. 2006, Petrescu, et al. 2005, Schroeder, et al. 2005).

5.2.2 Die Beeinflussung des CAR-vermittelten Thyroidhormon-Stoffwechsels durch PPAR α

Die Menge der Schilddrüsenhormone Thyroxin (T4) und Trijodthreonin (T3) im Serum korreliert mit der Höhe des Grundumsatzes und sinkt bei Nahrungskarenz. T3 ist die aktive Form, die über die Aktivierung des Thyroidhormon-Rezeptor die Thermogenese erhöht. Die

Deiodinase Typ 1 kann das Prohormon T4 entweder durch Deiodinierung des äußeren Ringes in aktives T3 umwandeln oder durch Deiodinierung des inneren Ringes inaktivieren. Bei sulfatiertem T4 wurde nur doch die Deiodinierung des inneren Ringes, d.h. die Inaktivierung, beobachtet. Ein weiterer Weg T4 zu inaktivieren und eliminieren ist die Glucuronidierung durch Mitglieder der UGT1-Familie und anschließende Exkretion. Interessanterweise wiesen auch Ratten, die längere Zeit mit PB behandelt wurden, weniger T4 und mehr glucuronidiertes T4 im Serum auf (Hood und Klaassen 2000). Sowohl PB als auch Nahrungskarenz induzierten CAR und CAR-Zielgene (M. Bauer, *et al.* 2004, Goodwin und Moore 2004, Maglich, *et al.* 2004, Qatanani, *et al.* 2005). Maglich *et al.* zeigten, dass CAR(-/-) Mäuse ohne Nahrungszufuhr signifikant mehr Gewicht verloren als Wildtypmäuse (Maglich, *et al.* 2004). Sie schlussfolgerten, dass die CAR-abhängig im Fasten induzierten Phase-II-Enzyme SULTN und UGT1A1 am Abbau des Schilddrüsenhormons T4 (Thyroxin), und damit der Senkung des Grundumsatzes bei Nahrungskarenz beteiligt sind (Hood und Klaassen 2000, Maglich, *et al.* 2004, Xie, *et al.* 2003). In weiterführenden Experimenten mit primären Hepatozyten der Ratte konnte gezeigt werden, dass zusätzliche Behandlung mit WY 14643 die PB-vermittelte Degradation von T3 im Kulturmedium beschleunigte (nicht gezeigt). Wie bereits erwähnt, konnte bei gefasteten PPAR α (-/-)-Sv/129-Mäusen im Gegensatz zu Wildtypmäusen keine Steigerung der CAR-mRNA-Expression beobachtet werden (Wieneke, *et al.* 2007), wohingegen bei dem von Martin, *et al.* verwendeten PPAR α (-/-)-Mausstamm bereits eine erhöhte basale CAR-Expression detektiert werden konnte (Martin, *et al.* 2007). Fasten wurde von den beiden PPAR α (-/-)-Mausstämmen unterschiedlich gut toleriert. Während bei PPAR α (-/-)-Sv/129-Mäuse bereits eine Fastenperiode von 24 h zu erheblicher Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens führte, duldeten PPAR α (-/-)-C57BL/6J-Mäuse längeres Fasten. Eventuell besitzen PPAR α (-/-)-C57BL/6J-Mäuse aufgrund der erhöhten basale CAR-Expression einen niedrigeren Grundumsatz als PPAR α (-/-)-Sv/129-Mäuse.

PPAR α koordiniert im Fasten womöglich nicht nur die Energiebereitstellung aus Fettsäuren sondern auch - über die Induktion von CAR - den Abbau der Schilddrüsenhormone, dass heißt die Senkung des Grundumsatzes.

5.2.3 Die Beeinflussung der Nahrungsaufnahme durch CAR und PPAR α

Nach Behandlung von Ratten mit PPAR α -Agonisten verringerte sich interessanterweise deren Nahrungsaufnahme (Larsen, *et al.* 2003). Die Nahrungsaufnahme wird im Hypothalamus durch Glucocorticoide (Cortisol, Dexamethason), über GR-abhängige Induktion von Neuropeptid Y (NPY) und NPY-Rezeptorsubtyp I (NPYR-I), verstärkt (Cavagnini, *et al.* 2000, Misaki, *et al.* 1992, Weng, *et al.* 1995). Dexamethason wird in der Leber hauptsächlich durch CYP3A4, welches durch PXR, aber auch CAR aktiviert wird, abgebaut (Cholerton, *et al.* 1992, Maglich, *et al.* 2002, Pascussi, *et al.* 2001). Wenn CYP3A4 bereits vor der Behandlung mit

Dexamethason mit einem CAR-Aktivator induziert wurde, konnte kein orexigener Effekt beobachtet werden (Qatanani, *et al.* 2004). Dexamethason selbst aktiviert nur den Glucocorticoid-Rezeptor (GR). Da im humanen CAR-Promotor ein funktionales Glucocorticoid-responsives Element (GRE) identifiziert werden konnte, förderte Dexamethason so die Aktivität von CAR und seinen eignen Abbau durch CAR-abhängig induziertes CYP3A4 (Pascussi, *et al.* 2003, Pascussi, *et al.* 2001, Sueyoshi, *et al.* 1999). In CAR(-/-)-Mäusen war im Vergleich zu Wildtypmäusen der Abbau von Dexamethason gestört. Sie zeigten daher nach Dexamethason-Behandlung eine verstärkte Futteraufnahme und erhöhte NPY und NPYR-I mRNA-Expression (Qatanani, *et al.* 2004). Eine Ursache für die geringere Nahrungsaufnahme in PPAR α -Agonisten behandelten Ratten könnte ein verstärkter Abbau von Glucocorticoiden durch CAR-abhängig induziertes CYP3A4 sein. Die geringere Menge an Glucocorticoiden im Blut könnte im Hypothalamus zur Senkung der NPY und NPYR-I-Expression und damit zu verringerter Nahrungsaufnahme führen. Auch hier wäre es interessant, die beiden unterschiedlichen PPAR α (-/-)-Mausstämme (C57BL/6J- und Sv/129-Mäuse) hinsichtlich ihrer Futteraufnahme und der CAR, NPY und NPYR-I-Expression im Gehirn mit dem entsprechenden Wildtyp und mit Wistar-Ratten zu vergleichen. Es wäre zu erwarten, dass die NPY und NPYR-I-Expression und damit die Futteraufnahme in PPAR α (-/-)-C57BL/6J-Mäusen aufgrund der höheren basalen CAR-Expression geringer ausfällt als in PPAR α (-/-)-Sv/129-Mäusen.

5.3 Die Bedeutung einer PPAR α -abhängigen Induktion von CAR für weitere Stoffwechselwege

Neben der bereits beschriebenen Beeinflussung der Adaptation an Nahrungskarenz, sind in der Literatur noch andere Stoffwechselprozesse beschrieben, in denen eine PPAR α -abhängige Induktion von CAR von Bedeutung sein könnte. So sind CAR-abhängig induzierte Enzyme der Phasen der Biotransformation wichtig für die Verstoffwechslung von Xenobiotika. Auch der Cholesterol- und Gallensäure-Stoffwechsel wird durch CAR und PPAR α beeinflusst.

5.3.1 Die Beeinflussung des Fremdstoffmetabolismus durch eine PPAR α -abhängige Induktion von CAR

Zu den murinen, CAR-abhängig regulierten, fremdstoffmetabolisierenden Enzymen gehören z.B. die Phase-I-Enzyme der CYP2B-Familie, die Phase-II-Enzyme GST1A1, SULTN, UGT1A1, UGT2B1 und die Phase-III-Enzyme MRP 1-3 (Maglich, *et al.* 2002, Qatanani, *et al.* 2005). Unter Bedingungen in denen PPAR α aktiviert wird (Keller, *et al.* 1993, Kersten, *et al.* 1999, Kliewer, *et al.* 1997), konnte in Nagern oft eine erhöhte CAR-Expression festgestellt werden. So wurden im Diabetes vermehrt CAR und dessen Zielgen CYP2B exprimiert (Pass,

et al. 2002, Truong, *et al.* 2005, Yoshinari, *et al.* 2006). Während des Fastens und bei Behandlung mit Ketonkörpern oder Fischöl wurde ebenfalls eine erhöhte Expression von CAR und/ oder CAR-Zielgenen beobachtet (Chen, *et al.* 2001, Maglich, *et al.* 2004, Martin, *et al.* 2007, Zangar und Novak 1997). Auch in der vorliegenden Arbeit steigerte die Verfütterung von Fischöl, das reich an Eicosapentaensäure ist, die CAR-Expression bei Ratten signifikant (Abb. 38). Da neben dem Barbiturat PB, endogen anfallendes Bilirubin, aber auch Umweltgifte (z.B. DDT) und Insektizide (z.B. Permethrin) zu den CAR-Aktivatoren zählen, führt eine erhöhte CAR-Expression leicht zu einer erhöhten CAR-Aktivität. Interindividuelle Unterschiede in der Expression des humanen CYP2B1-Homologs CYP2B6 spielen eine große Rolle bei der Bekämpfung von Krebs mit Cyclophosphamid. CYP2B6 katalysiert die Aktivierung von Cyclophosphamid zu 4-Hydroxy-Cyclophosphamid, das dann mutagen und cytostatisch wirkt und so das Wachstum der Tumorzellen bekämpft (Chang, *et al.* 1997, Code, *et al.* 1997, Yamazaki, *et al.* 2002). Das Analgetikum Acetaminophen (Paracetamol) wird durch CYP2B6 zu dem hepatotoxischen, unerwünschten Zwischenprodukt N-Acetyl-*p*-benzoquinoneimin umgewandelt. In Bezug auf eine PPAR α -abhängige CAR-Expression sind, abhängig von dem Medikament, verschiedene Szenarien denkbar. In besonderen Stoffwechsellagen, die die Aktivierung von PPAR α begünstigen (Diabetes, fettreiche Diät, Fasten, Behandlung der Dyslipidämie mit Fibraten), könnte eine PPAR α -abhängige Induktion der CAR-Expression die Aktivität von Phase-I-Enzymen wie CYP2B6 oder auch CYP3A4 steigern. Bei Medikamenten, die durch CAR-abhängige Phase-I-Enzyme inaktiviert werden, wäre dann die Wirksamkeit herabgesetzt. Hingegen die Wirksamkeit von Cyclophosphamid, aber auch die Hepatotoxizität von Acetaminophen könnten ansteigen. Neben der Aktivierung durch Phase-I-Enzyme hängt die Wirksamkeit dieser Medikamente auch von der Effizienz der Konjugation durch Phase-II-Enzyme und der Exkretion durch Phase-III-Enzyme ab. Da erste Hinweise vorliegen, dass die PB-abhängige Induktion von CAR-Zielgenen in Abhängigkeit von ihrem PBREM in Hepatozyten durch Behandlung mit PPAR α -Agonisten nicht nur positiv sondern auch negativ beeinflusst werden kann (nicht gezeigt), ist es auch möglich, dass durch PPAR α -Agonisten notwendige CAR-abhängige Phase-II- und Phase-III-Enzyme reprimiert werden. Es wurde z.B. beobachtet, dass PPAR α -(-/-)-Mäusen wesentlich später aus der Narkose (Pentobarbital) erwachten als vergleichbare Wildtypmäuse. Der Abbau von wirksamen, aber auch toxischen Zwischenprodukten könnte sich also verzögern und die Wirksamkeit der Medikamente verändern oder zu Schädigung der Leber führen.

Kürzlich berichteten Guo *et al.*, dass Fibrate und synthetische PPAR α -Agonisten, wenn sie in hohen Dosen verabreicht wurden, als CAR-Antagonisten in die CAR-LBD binden und die CAR-Aktivität hemmen können (Guo, *et al.* 2007). Diese Inaktivierung von CAR würde den Abbau CAR-abhängig verstoffwechselter Medikamente empfindlich beeinträchtigen. Allerdings konnten Guo *et al.*, keine Hemmung der CAR-Aktivität durch endogene PPAR α -Agonisten oder therapeutische Dosen an Fibraten nachweisen (Guo, *et al.* 2007).

5.3.2 Die Beeinflussung des Cholesterol- und Gallensäuremetabolismus durch eine PPAR α -abhängige Induktion von CAR

HNF4 α -Homodimere sowie LXR α -, FXR- CAR- und PPAR α -Heterodimere bilden in der Leber gemeinsam ein Netzwerk zur Regulation des Fettstoffwechsels sowie der Cholesterol- und Gallensäure-Biosynthese (Abb. 41). Der Cholesterol- und Gallensäuremetabolismus wird hauptsächlich durch die nukleären Rezeptoren LXR α und FXR kontrolliert. Dies ist von entscheidender Bedeutung, denn ein Mangel an Cholesterol beeinträchtigt z.B. die Steroidhormonsynthese. Ein Überschuß hingegen kann die Entstehung von Cholesterinsteinen und Atherosklerose fördern. Gallensäuren wiederum sind wichtig für die Bildung von Micellen bei der Fettverdauung können aber im Überschuß zum Ikterus und Nervenschädigung führen.

Die LXR α -abhängige Gallensäuresynthese. Aktivierter LXR verstärkt über die Induktion von CYP7A1 (in Nagern) die Umsetzung von Cholesterol zu Gallensäuren (Abb. 41). Zusätzlich stimuliert er über die Induktion von SREBP-1c die Fettsäuresynthese und VLDL-Sekretion und inhibiert weiterhin die PPAR α -abhängige Fettsäureoxidation durch Blockieren der PPRES von PPAR α -Zielgenen (Chiang, *et al.* 2001, Ide, *et al.* 2003, Pawar, *et al.* 2003). LXR α kann PPAR α -abhängig induziert werden und wird durch Oxysterole, die nach Cholesterolfütterung in der Leber akkumulieren, oder Mevalonat, ein Zwischenprodukt der Cholesterolbiosynthese, aktiviert (Francis, *et al.* 2003, Tobin, *et al.* 2000).

Der FXR-abhängige Gallensäureabbau. FXR hingegen senkt den Gallensäurespiegel und wird durch sekundäre Gallensäuren aktiviert (Pineda Torra, *et al.* 2003). Aktiviertes FXR induziert SHP, welches die CYP7A1-Transkription und somit die Entstehung von Gallensäuren hemmt (Abb. 41) (Eloranta und Kullak-Ublick 2005, Goodwin, *et al.* 2000). FXR induziert außerdem den Gallensäureabbau. Im Einzelnen werden die Konjugation mit UDP (UGT2B4) oder Taurin oder Glycin zu Gallensalzen (Bacs und Bat), der Export der Gallensalze (BSEP, MDR3) und der Rücktransport sekundärer Gallensäuren aus dem Ileum (I-BABP) induziert (Abb. 41). So verhindert FXR zum einen die Depletion von Cholesterol und zum anderen die Anhäufung von toxischen Gallensalzen. Auch PPAR α wird durch FXR induziert (Pineda Torra, *et al.* 2003).

PPAR α und der Gallensäuremetabolismus. PPAR α -abhängig wird, z.B. im Fasten oder nach Behandlung mit PPAR α -Agonisten, über die Repression der LXR α -Zielgene CYP7A1 und SREBP1c die Gallensäure- und Fettsäuresynthese gehemmt (Abb. 41) (Gbaguidi und Agellon 2002, Kersten, *et al.* 1999, Marrapodi und Chiang 2000, Patel, *et al.* 2000, Pawar, *et al.* 2003, Yoshikawa, *et al.* 2003). Aufgrund der gehemmten Gallensäuresynthese besteht daher bei Fibratbehandlung ein vermehrtes Risiko Cholesterinsteine zu bilden.

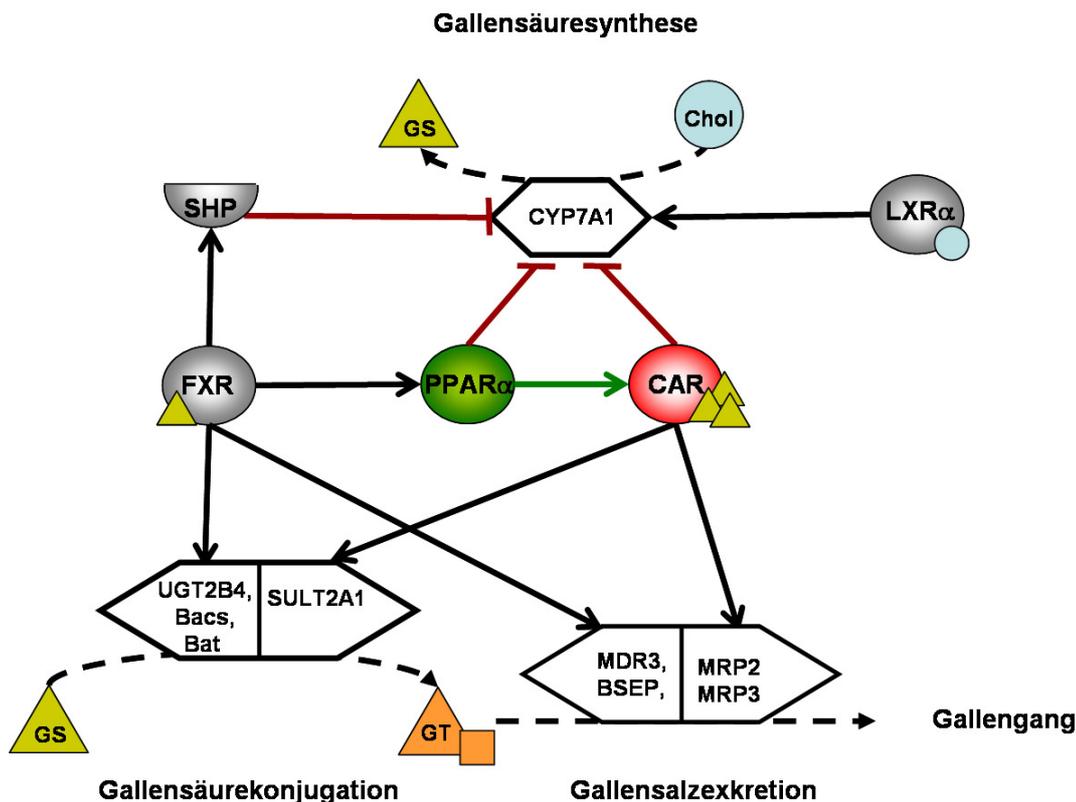


Abb. 41: Das Netzwerk nukleärer Rezeptoren zur Regulation des Cholesterol- und Gallensäuremetabolismus in Nagern.

FXR und LXR α sind die Hauptregulatoren des Cholesterol- und Gallensäure-Metabolismus. Oxysterole aktivieren LXR α , welcher dann neben HNF4 α über die Induktion von CYP7A1 die Synthese von Gallensäuren (GS) aus Cholesterol aktiviert. Eine erhöhte Menge an Gallensäuren wiederum aktiviert FXR, welcher über die Induktion von SHP die CYP7A1-Expression und damit die Gallensäuresynthese, hemmt. Gleichzeitig senkt FXR den Gallensäurespiegel, indem er Enzyme induziert, die die Konjugation der Gallensäuren (UGT2B4, Bacs, Bat) zu Gallensalzen (GT) und die Exkretion dieser Gallensalze (MDR3, BSEP) in den Gallengang fördern. CAR wird durch exzessiv hohe Gallensäurespiegel aktiviert und induziert dann ebenfalls die Expression von Enzymen, die die Konjugation (SULT2A1) und Exkretion (MRP2, MRP3) der Gallensäuren beschleunigen. Auch die Synthese toxischer Gallensäuren (CYP7A1) wird durch CAR und PPAR α gehemmt. Da PPAR α in Zusammenhang mit der Regulation des Fettstoffwechsels LXR α -Effekte antagonisiert, erscheint es durchaus sinnvoll, dass PPAR α durch die Induktion von CAR auch den Gallensäureabbau unterstützt.

CAR und der Gallensäuremetabolismus. Eine hohe Konzentration an Gallensäuren aktiviert CAR (Guo, *et al.* 2003, Xie, *et al.* 2003). Es ist ein Schutzmechanismus, der in die Gallensäuresynthese eingreifen kann, wenn der FXR-abhängige Gallensäureabbau unzureichend ist (Huang, *et al.* 2003, Huang, *et al.* 2006). CAR führt, wie FXR, zur Senkung des Gallensäurespiegels. Zum einen hemmt CAR die Gallensäuresynthese (CYP7A1) und zum anderen verstärkt er, über die Induktion von Sulfatasen und Transportern wie MRP2 und 3, die Gallensäureexkretion (Abb. 41) (Miao, *et al.* 2006).

In Zusammenhang mit der Regulation des Fettstoffwechsels antagonisiert PPAR α die anabole Wirkung von LXR α . Durch die Induktion von CAR unterstützt PPAR α möglicherweise auch den Gallensäureabbau. CAR könnte dann vermehrt durch Gallensäuren aktiviert werden und neben FXR zur Induktion des Abbaus und der Exkretion von Gallensäuren beitragen. Dieser zusätzliche Regelkreis könnte verhindern, dass sich toxische Cholesterolmetabolite in den Hepatozyten anhäufen.

5.4 Schlussfolgerung

Die Beobachtung, dass synthetische PPAR α -Agonisten die PB-abhängige Aktivität des CAR-Zielgens CYP2B steigern, wurde in der vorliegenden Arbeit eingehend untersucht.

Synthetische PPAR α -Agonisten verstärkten über ein potentielles PPRE im CAR-Promotorbereich von -942 bp bis -930 bp oberhalb des mutmaßlichen Transkriptionstarts die CAR-Transkription und steigerten so die CAR-Expression. Da diese PPAR α -Agonisten-vermittelte CAR-mRNA-Expression in PPAR α -(-/-)-Mäusen fehlte und außerdem in *band shift* Experimenten gezeigt werden konnte, dass dieses PPRE nach PPAR α -Überexpression verstärkt Kernprotein akkumulierte, gehört CAR mit großer Wahrscheinlichkeit auch zu den PPAR α -Zielgenen (Wieneke, *et al.* 2007). CAR ist im inaktiven Zustand entweder im Cytosol im Komplex mit HSP:90 und CCRP an das Cytoskelett gebunden oder aber im Kern durch inverse Agonisten wie Androstan gehemmt. Die Transkription von CAR-Zielgenen ist folglich nur möglich, wenn CAR zuvor, z.B. durch PB oder PB-ähnliche Aktivatoren, wie Insektizide, aktiviert wurde. Tatsächlich konnten in primär kultivierten Hepatozyten der Ratte die PBREM-abhängige CYP2B1-Transkription, die CYP2B-mRNA- und CYP2B-Proteinexpression sowie die CYP2B-Aktivität nur nach Behandlung mit PB detektiert werden. Zusätzliche Inkubation mit den synthetischen PPAR α -Agonisten WY 14643 und GW 7647 steigerte diese PB- und PBREM-abhängige CYP2B1-Induktion dosis- und zeitabhängig. Nach Induktion von CAR durch PPAR α verfügen Hepatozyten offenbar über mehr CAR, das aktiviert werden kann, um die Expression von CAR-Zielgenen zu steigern. Da synthetische PPAR α -Agonisten auch *in vivo* die CAR-Expression und die PB-abhängige CYP2B-Aktivität verstärkten, könnte eine PPAR α -abhängige CAR-Expression physiologisch relevant sein.

Durch ihre Beteiligung am Abbau von Schilddrüsenhormonen sind CAR-Zielgene an der Regulation des Grundumsatzes beteiligt. Die fastenabhängige Steigerung der CAR-Expression ist in PPAR α -(-/-)-Mäusen, die basale CAR-Expression hingegen in HNF4 α -(-/-)-Mäusen gestört. Neben HNF4 α als Regulator der basalen CAR-Expression könnte PPAR α für die fastenabhängige Induktion der CAR-Expression, die die Senkung des Grundumsatzes zum Ziel hat, von Bedeutung sein. Die unterschiedlichen PPAR α -(-/-)-Mausstämme in denen CAR basal entweder reprimiert oder überexprimiert wird, könnten für eine Reihe von weiteren Experimenten genutzt werden. So wäre es interessant zu wissen, ob PPAR α -(-/-)-C57BL/6J-Mäusen aufgrund der erhöhten basalen CAR-Expression einen vermehrten

Schilddrüsenhormonabbau und einen niedrigeren Grundumsatz als PPAR α -(-/-)-Sv/129-Mäuse vorweisen. Zudem könnte festgestellt werden, ob die NPY und NPYR-I-Expression im Gehirn und damit die Futteraufnahme in PPAR α -(-/-)-C57BL/6J-Mäusen aufgrund der höheren basalen CAR-Expression verglichen mit dem Wildtyp geringer ausfällt als in PPAR α -(-/-)-Sv/129-Mäusen und aufgrund des schnelleren CAR-abhängigen Abbaus weniger stark durch Dexamethason induziert werden kann. Des Weiteren müsste dann erfasst werden, ob sich die die NPY und NPYR-I-Expression nach Aktivierung von PPAR α durch Fasten oder Fischöl in Sv/129-Wildtypmäusen und den entsprechenden PPAR α -(-/-)-Sv/129-Mäusen aufgrund einer PPAR α -abhängigen CAR-Induktion unterscheidet. Da Ding *et al.* ein funktionelles HNF4 α -responsives Element im proximalen murinen CAR-Promotor identifizierten, könnte eine vermehrte Aktivierung von HNF4 α zu der beobachteten erhöhten basalen CAR-Expression in dem einen Mausmodell beitragen (Ding, *et al.* 2006). Anhand weiterer HNF4 α -Zielgene, z.B. HNF1 α , ließe sich feststellen, ob HNF4 α in diesem Stamm tatsächlich aktiver ist.

Auch bei der Regulation des Gallensäuremetabolismus könnte eine PPAR α -abhängige CAR-Expression und damit verbesserte Expression von CAR-Zielgenen einen Schutzmechanismus gegen exzessive Gallensäurebelastung im Hepatozyten darstellen. Der Phänotyp der PPAR α -(-/-)-Mäusen unterscheidet sich unter Standardbedingungen nur wenig vom Wildtyp, viele Mangelerscheinungen werden erst im Fasten sichtbar. Es wäre jedoch auch interessant die Langzeitfolgen für den Cholesteroll und Fettstoffwechsel unter Standardbedingungen bei PPAR α -(-/-)-C57BL/6J-Mäusen (CAR-überexprimierend) und PPAR α -(-/-)-Sv/129-Mäusen zu erfassen.

Es ist bekannt, dass Menschen aufgrund ihrer variablen Ausstattung mit Enzymen der Biotransformation (Polymorphismen, Umweltbelastung) Medikamente unterschiedlich schnell metabolisieren. Unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen, in denen PPAR α aktiviert wird (fette Diät, Fasten, Diabetes, Behandlung der Dyslipidämie mit Fibraten), könnte eine PPAR α -abhängige Induktion der CAR-Expression die Aktivität von Phase-I-Enzymen wie CYP2B6 verstärken und damit die Aktivierung von Cyclophosphamid und die Giftung von Acetaminophen beschleunigen. Ein Einfluss von PPAR α -Aktivierung auf CAR-abhängige Phase-II- und Phase-III-Enzyme und damit die Wirkung der von Ihnen abgebauten Medikamente erscheint wahrscheinlich. Bei der Behandlung mit Medikamenten, die über toxische Zwischenstufen abgebaut werden, könnten Menschen mit erhöhter PPAR α -Aktivität einem höheren Risiko der Organschädigung ausgesetzt sein.

Das von Kupferzellen sezernierte PGD₂ schien die Expression des CAR-Zielgens CYP2B1 auf einem noch nicht bekannten PPAR α -unabhängigen Weg zu fördern. Um abzuklären, ob es sich dabei um einen CYP2B1-spezifischen oder einen generellen Mechanismus der Beeinflussung der CAR-Zielgenexpression durch PGD₂-Behandlung handelt, müssten zunächst weitere CAR-Zielgene untersucht werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

ABDELRAZZAK, Z, CORCOS, L, FAUTREL, A and GUILLOUZO, A (1995): *Interleukin-1-Beta Antagonizes Phenobarbital Induction of Several Major Cytochromes P450 in Adult-Rat Hepatocytes in Primary Culture.* FEBS Lett. 366(2-3):159-164

ADAMSON, AW, SUCHANKOVA, G, RUFO, C, NAKAMURA, MT, TERAN-GARCIA, M, CLARKE, SD and GETTYS, TW (2006): *Hepatocyte nuclear factor-4alpha contributes to carbohydrate-induced transcriptional activation of hepatic fatty acid synthase.* Biochem J 399(2):285-295

AIDA, K and NEGISHI, M (1991): *Posttranscriptional regulation of coumarin 7-hydroxylase induction by xenobiotics in mouse liver: mRNA stabilization by pyrazole.* Biochemistry 30(32):8041-8045

AKIYAMA, TE, NICOL, CJ, FIEVET, C, STAELS, B, WARD, JM, AUWERX, J, LEE, SS, GONZALEZ, FJ and PETERS, JM (2001): *Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha regulates lipid homeostasis, but is not associated with obesity: studies with congenic mouse lines.* J Biol Chem 276(42):39088-39093

AMERO, SA, KRETSINGER, RH, MONCRIEF, ND, YAMAMOTO, KR and PEARSON, WR (1992): *The origin of nuclear receptor proteins: a single precursor distinct from other transcription factors.* Mol Endocrinol 6(1):3-7

ARANDA, A and PASCUAL, A (2001): *Nuclear hormone receptors and gene expression.* Physiol Rev 81(3):1269-1304

ASSENAT, E, GERBAL-CHALOIN, S, LARREY, D, SARIC, J, FABRE, JM, MAUREL, P, VILAREM, MJ and PASCUSI, JM (2004): *Interleukin 1beta inhibits CAR-induced expression of hepatic genes involved in drug and bilirubin clearance.* Hepatology 40(4):951-960

AUERBACH, SS, STONER, MA, SU, S and OMIECINSKI, CJ (2005): *Retinoid X receptor-alpha-dependent transactivation by a naturally occurring structural variant of human constitutive androstane receptor (NR1I3).* Mol Pharmacol 68(5):1239-1253

AUERBACH, SS, RAMSDEN, R, STONER, MA, VERLINDE, C, HASSETT, C and OMIECINSKI, CJ (2003): *Alternatively spliced isoforms of the human constitutive androstane receptor.* Nucleic Acids Res 31(12):3194-3207

BAES, M, GULICK, T, CHOI, HS, MARTINOLI, MG, SIMHA, D and MOORE, DD (1994): *A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements.* Mol Cell Biol 14(3):1544-1552

BAUER, D, WOLFRAM, N, KAHL, GF and HIRSCH-ERNST, KI (2004): *Transcriptional regulation of CYP2B1 induction in primary rat hepatocyte cultures: repression by epidermal growth factor is mediated via a distal enhancer region.* Mol Pharmacol 65(1):172-180

BAUER, M, HAMM, AC, BONAUS, M, JACOB, A, JAEKEL, J, SCHORLE, H, PANKRATZ, MJ and KATZENBERGER, JD (2004): *Starvation response in mouse liver shows strong correlation with life-span-prolonging processes.* Physiol Genomics 17(2):230-244

- BEIGNEUX, AP, MOSER, AH, SHIGENAGA, JK, GRUNFELD, C and FEINGOLD, KR (2002):** *Reduction in cytochrome P-450 enzyme expression is associated with repression of CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) in mouse liver during the acute phase response.* Biochem Biophys Res Commun 293(1):145-149
- BLANQUART, C, MANSOURI, R, FRUCHART, JC, STAELS, B and GLINEUR, C (2004):** *Different ways to regulate the PPARalpha stability.* Biochem Biophys Res Commun 319(2):663-670
- BOURGUET, W, GERMAIN, P and GRONEMEYER, H (2000):** *Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications.* Trends Pharmacol Sci 21(10):381-388
- BOURGUET, W, RUFF, M, CHAMBON, P, GRONEMEYER, H and MORAS, D (1995):** *Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha.* Nature 375(6530):377-382
- BROWN, BL, ALLIS, JW, SIMMONS, JE and HOUSE, DE (1995):** *Fasting for less than 24 h induces cytochrome P450 2E1 and 2B1/2 activities in rats.* Toxicol Lett 81(1):39-44
- CAVAGNINI, F, CROCI, M, PUTIGNANO, P, PETRONI, ML and INVITTI, C (2000):** *Glucocorticoids and neuroendocrine function.* Int J Obes Relat Metab Disord 24 Suppl 2(S77-79)
- CHANG, TK, YU, L, MAUREL, P and WAXMAN, DJ (1997):** *Enhanced cyclophosphamide and ifosfamide activation in primary human hepatocyte cultures: response to cytochrome P-450 inducers and autoinduction by oxazaphosphorines.* Cancer Res 57(10):1946-1954
- CHEN, HW, YANG, JJ, TSAI, CW, WU, JJ, SHEEN, LY, OU, CC and LIU, CK (2001):** *Dietary fat and garlic oil independently regulate hepatic cytochrome p(450) 2B1 and the placental form of glutathione S-transferase expression in rats.* J Nutr 131(5):1438-1443
- CHIANG, JY, KIMMEL, R and STROUP, D (2001):** *Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRalpha).* Gene 262(1-2):257-265
- CHOI, HS, CHUNG, M, TZAMELI, I, SIMHA, D, LEE, YK, SEOL, W and MOORE, DD (1997):** *Differential transactivation by two isoforms of the orphan nuclear hormone receptor CAR.* J Biol Chem 272(38):23565-23571
- CHOLERTON, S, DALY, AK and IDLE, JR (1992):** *The role of individual human cytochromes P450 in drug metabolism and clinical response.* Trends Pharmacol Sci 13(12):434-439
- CLARK, MA, WILLIAMS, JF, GOTTSCHALL, PE and WECKER, L (1996):** *Effects of phenobarbital and interleukin-6 on cytochrome P4502B1 and 2B2 in cultured rat hepatocytes.* Biochem. Pharmacol. 51(5):701-706
- CODE, EL, CRESPI, CL, PENMAN, BW, GONZALEZ, FJ, CHANG, TK and WAXMAN, DJ (1997):** *Human cytochrome P4502B6: interindividual hepatic expression, substrate specificity, and role in procarcinogen activation.* Drug Metab Dispos 25(8):985-993
- CONNEY, AH (1982):** *Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture.* Cancer Res 42(12):4875-4917
- CORCOS, L and LAGADIC-GOSSMANN, D (2001):** *Gene induction by Phenobarbital: an update on an old question that receives key novel answers.* Pharmacol Toxicol 89(3):113-122

- CORTON, JC, ANDERSON, SP and STAUBER, A (2000):** *Central role of peroxisome proliferator-activated receptors in the actions of peroxisome proliferators.* *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40(491-518
- CORTON, JC, APTE, U, ANDERSON, SP, LIMAYE, P, YOON, L, LATENDRESSE, J, DUNN, C, EVERITT, JI, VOSS, KA, SWANSON, C, KIMBROUGH, C, WONG, JS, GILL, SS, CHANDRARATNA, RA, KWAK, MK, KENSLER, TW, STULNIG, TM, STEFFENSEN, KR, GUSTAFSSON, JA and MEHENDALE, HM (2004):** *Mimetics of caloric restriction include agonists of lipid-activated nuclear receptors.* *J Biol Chem* 279(44):46204-46212
- DECKER, K (1990):** *Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells).* *Eur J Biochem* 192(2):245-261
- DESVERGNE, B and WAHLI, W (1999):** *Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism.* *Endocr Rev* 20(5):649-688
- DING, X, LICHTI, K, KIM, I, GONZALEZ, FJ and STAUDINGER, JL (2006):** *Regulation of constitutive androstane receptor and its target genes by fasting, cAMP, hepatocyte nuclear factor alpha, and the coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha.* *J Biol Chem* 281(36):26540-26551
- DIRENZO, J, SODERSTROM, M, KUROKAWA, R, OGLIASTRO, MH, RICOTE, M, INGREY, S, HORLEIN, A, ROSENFELD, MG and GLASS, CK (1997):** *Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors.* *Mol Cell Biol* 17(4):2166-2176
- ELIAS, AN and GWINUP, G (1980):** *Effects of some clinically encountered drugs on steroid synthesis and degradation.* *Metabolism* 29(6):582-595
- ELORANTA, JJ and KULLAK-UBLICK, GA (2005):** *Coordinate transcriptional regulation of bile acid homeostasis and drug metabolism.* *Arch Biochem Biophys* 433(2):397-412
- ESCRIVA, H, DELAUNAY, F and LAUDET, V (2000):** *Ligand binding and nuclear receptor evolution.* *Bioessays* 22(8):717-727
- ESCRIVA, H, SAFI, R, HANNI, C, LANGLOIS, MC, SAUMITOU-LAPRADE, P, STEHELIN, D, CAPRON, A, PIERCE, R and LAUDET, V (1997):** *Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(13):6803-6808
- FAGAN, TE and ROMANI, A (2000):** *Activation of Na(+)- and Ca(2+)-dependent Mg(2+) extrusion by alpha(1)- and beta-adrenergic agonists in rat liver cells.* *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279(5):G943-950
- FEIGE, JN, GELMAN, L, TUDOR, C, ENGELBORGH, Y, WAHLI, W and DESVERGNE, B (2005):** *Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand.* *J Biol Chem* 280(18):17880-17890
- FENNEKOHL, A, SCHIEFERDECKER, HL, JUNGERMANN, K and PÜSCHEL, GP (1999):** *Differential expression of prostanoid receptors in hepatocytes, Kupffer cells, sinusoidal endothelial cells and stellate cells of rat liver.* *J Hepatol* 30(1):38-47
- FERRE, P (2004):** *The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity.* *Diabetes* 53 Suppl 1(S43-50

- FORETZ, M, ANCELLIN, N, ANDREELLI, F, SAINTILLAN, Y, GRONDIN, P, KAHN, A, THORENS, B, VAULONT, S and VIOLLET, B (2005):** *Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver.* Diabetes 54(5):1331-1339
- FORMAN, BM, CHEN, J and EVANS, RM (1997):** *Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta.* Proc Natl Acad Sci U S A 94(9):4312-4317
- FORMAN, BM, TZAMELI, I, CHOI, HS, CHEN, J, SIMHA, D, SEOL, W, EVANS, RM and MOORE, DD (1998):** *Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta.* Nature 395(6702):612-615
- FRANCIS, GA, FAYARD, E, PICARD, F and AUWERX, J (2003):** *Nuclear receptors and the control of metabolism.* Annu Rev Physiol 65(261-311)
- FRASER, DJ, ZUMSTEG, A and MEYER, UA (2003):** *Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor activate a drug-responsive enhancer of the murine 5-aminolevulinic acid synthase gene.* J Biol Chem 278(41):39392-39401
- GBAGUIDI, GF and AGELLON, LB (2002):** *The atypical interaction of peroxisome proliferator-activated receptor alpha with liver X receptor alpha antagonizes the stimulatory effect of their respective ligands on the murine cholesterol 7alpha-hydroxylase gene promoter.* Biochim Biophys Acta 1583(2):229-236
- GEARING, KL, GOTTLICHER, M, TBOUL, M, WIDMARK, E and GUSTAFSSON, JA (1993):** *Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A 90(4):1440-1444
- GERMAIN, P, IYER, J, ZECHEL, C and GRONEMEYER, H (2002):** *Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy.* Nature 415(6868):187-192
- GERMAIN, P, STAELS, B, DACQUET, C, SPEDDING, M and LAUDET, V (2006):** *Overview of nomenclature of nuclear receptors.* Pharmacol Rev 58(4):685-704
- GERVOIS, P, KLEEMANN, R, PILON, A, PERCEVAULT, F, KOENIG, W, STAELS, B and KOOISTRA, T (2004):** *Global suppression of IL-6-induced acute phase response gene expression after chronic in vivo treatment with the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator fenofibrate.* J Biol Chem 279(16):16154-16160
- GERVOIS, P, VU-DAC, N, KLEEMANN, R, KOCKX, M, DUBOIS, G, LAINE, B, KOSYKH, V, FRUCHART, JC, KOOISTRA, T and STAELS, B (2001):** *Negative regulation of human fibrinogen gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists via inhibition of CCAAT box/enhancer-binding protein beta.* J Biol Chem 276(36):33471-33477
- GHOSE, R, ZIMMERMAN, TL, THEVANANTHER, S and KARPEN, SJ (2004):** *Endotoxin leads to rapid subcellular re-localization of hepatic RXRalpha: A novel mechanism for reduced hepatic gene expression in inflammation.* Nucl Recept 2(1):4
- GOODWIN, B and MOORE, JT (2004):** *CAR: detailing new models.* Trends Pharmacol Sci 25(8):437-441

GOODWIN, B, JONES, SA, PRICE, RR, WATSON, MA, MCKEE, DD, MOORE, LB, GALARDI, C, WILSON, JG, LEWIS, MC, ROTH, ME, MALONEY, PR, WILLSON, TM and KLIEWER, SA (2000): *A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis.* Mol Cell 6(3):517-526

GRAGNOLI, C, LINDNER, T, COCKBURN, BN, KAISAKI, PJ, GRAGNOLI, F, MAROZZI, G and BELL, GI (1997): *Maturity-onset diabetes of the young due to a mutation in the hepatocyte nuclear factor-4 alpha binding site in the promoter of the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene.* Diabetes 46(10):1648-1651

GUO, D, SARKAR, J, AHMED, MR, VISWAKARMA, N, JIA, Y, YU, S, SAMBASIVA RAO, M and REDDY, JK (2006): *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein (PBP) but not PPAR-interacting protein (PRIP) is required for nuclear translocation of constitutive androstane receptor in mouse liver.* Biochem Biophys Res Commun 347(2):485-495

GUO, D, SARKAR, J, SUINO-POWELL, K, XU, Y, MATSUMOTO, K, JIA, Y, YU, S, KHARE, S, HALDAR, K, RAO, MS, FOREMAN, JE, MONGA, SP, PETERS, JM, XU, HE and REDDY, JK (2007): *Induction of nuclear translocation of CAR by PPARalpha synthetic ligands in mouse liver.* J Biol Chem

GUO, GL, LAMBERT, G, NEGISHI, M, WARD, JM, BREWER, HB, JR., KLIEWER, SA, GONZALEZ, FJ and SINAL, CJ (2003): *Complementary roles of Farnesoid X receptor, pregnane X receptor, and constitutive Androstane receptor in protection against bile acid toxicity.* J Biol Chem
HANDSCHIN, C and MEYER, UA (2005): *Regulatory network of lipid-sensing nuclear receptors: roles for CAR, PXR, LXR, and FXR.* Arch Biochem Biophys 433(2):387-396

HASHIMOTO, T, COOK, WS, QI, C, YELDANDI, AV, REDDY, JK and RAO, MS (2000): *Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting.* J Biol Chem 275(37):28918-28928

HATZIS, P and TALIANIDIS, I (2001): *Regulatory mechanisms controlling human hepatocyte nuclear factor 4alpha gene expression.* Mol Cell Biol 21(21):7320-7330

HERTZ, R, SHEENA, V, KALDERON, B, BERMAN, I and BAR-TANA, J (2001): *Suppression of hepatocyte nuclear factor-4alpha by acyl-CoA thioesters of hypolipidemic peroxisome proliferators.* Biochem Pharmacol 61(9):1057-1062

HERTZ, R, KALDERON, B, BYK, T, BERMAN, I, ZA'TARA, G, MAYER, R and BAR-TANA, J (2005): *Thioesterase activity and acyl-CoA/fatty acid cross-talk of hepatocyte nuclear factor-4{alpha}.* J Biol Chem 280(26):24451-24461

HIRSCH-ERNST, KI, SCHLAEFER, K, BAUER, D, HEDER, AF and KAHL, GF (2001): *Repression of phenobarbital-dependent CYP2B1 mRNA induction by reactive oxygen species in primary rat hepatocyte cultures.* Mol Pharmacol 59(6):1402-1409

HONKAKOSKI, P, SUEYOSHI, T and NEGISHI, M (2003): *Drug-activated nuclear receptors CAR and PXR.* Ann Med 35(3):172-182

HONKAKOSKI, P, ZELKO, I, SUEYOSHI, T and NEGISHI, M (1998): *The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene.* Mol Cell Biol 18(10):5652-5658

HOOD, A and KLAASSEN, CD (2000): *Differential effects of microsomal enzyme inducers on in vitro thyroxine (T(4)) and triiodothyronine (T(3)) glucuronidation.* Toxicol Sci 55(1):78-84

- HOSSEINPOUR, F, MOORE, R, NEGISHI, M and SUEYOSHI, T (2006):** *Serine 202 regulates the nuclear translocation of constitutive active/androstane receptor.* Mol Pharmacol 69(4):1095-1102
- HOSTETLER, HA, KIER, AB and SCHROEDER, F (2006):** *Very-long-chain and branched-chain fatty acyl-CoAs are high affinity ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha).* Biochemistry 45(24):7669-7681
- HSU, MH, PALMER, CN, SONG, W, GRIFFIN, KJ and JOHNSON, EF (1998):** *A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding.* J Biol Chem 273(43):27988-27997
- HUANG, W, ZHANG, J, CHUA, SS, QATANANI, M, HAN, Y, GRANATA, R and MOORE, DD (2003):** *Induction of bilirubin clearance by the constitutive androstane receptor (CAR).* Proc Natl Acad Sci U S A 100(7):4156-4161
- HUANG, W, MA, K, ZHANG, J, QATANANI, M, CUVILLIER, J, LIU, J, DONG, B, HUANG, X and MOORE, DD (2006):** *Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration.* Science 312(5771):233-236
- IDE, T, SHIMANO, H, YOSHIKAWA, T, YAHAGI, N, AMEMIYA-KUDO, M, MATSUZAKA, T, NAKAKUKI, M, YATOH, S, IZUKA, Y, TOMITA, S, OHASHI, K, TAKAHASHI, A, SONE, H, GOTODA, T, OSUGA, J, ISHIBASHI, S and YAMADA, N (2003):** *Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. II. LXRs suppress lipid degradation gene promoters through inhibition of PPAR signaling.* Mol Endocrinol 17(7):1255-1267
- IJPENBERG, A, JEANNIN, E, WAHLI, W and DESVERGNE, B (1997):** *Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element.* J Biol Chem 272(32):20108-20117
- JARUKAMJORN, K, SAKUMA, T, MIYAUURA, J and NEMOTO, N (1999):** *Different regulation of the expression of mouse hepatic cytochrome P450 2B enzymes by glucocorticoid and phenobarbital.* Arch Biochem Biophys 369(1):89-99
- JEMNITZ, K, LENGYEL, G and VERECZKEY, L (2002):** *In vitro induction of bilirubin conjugation in primary rat hepatocyte culture.* Biochem Biophys Res Commun 291(1):29-33
- JIA, Y, QI, C, KASHIREDDI, P, SURAPUREDDI, S, ZHU, YJ, RAO, MS, LE ROITH, D, CHAMBON, P, GONZALEZ, FJ and REDDY, JK (2004):** *Transcription coactivator PBP, the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein, is required for PPARalpha-regulated gene expression in liver.* J Biol Chem 279(23):24427-24434
- JOHRI, A, DHAWAN, A, LAKHAN SINGH, R and PARMAR, D (2006):** *Effect of prenatal exposure of deltamethrin on the ontogeny of xenobiotic metabolizing cytochrome P450s in the brain and liver of offsprings.* Toxicol Appl Pharmacol 214(3):279-289
- JOVER, R, BORT, R, GOMEZ-LECHON, MJ and CASTELL, JV (2001):** *Cytochrome P450 regulation by hepatocyte nuclear factor 4 in human hepatocytes: a study using adenovirus-mediated antisense targeting.* Hepatology 33(3):668-675
- JUMP, DB (2002):** *Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription.* Curr Opin Lipidol 13(2):155-164

KAHN, BB, ALQUIER, T, CARLING, D and HARDIE, DG (2005): *AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism.* Cell Metab 1(1):15-25

KAKIZAKI, S, YAMAMOTO, Y, UEDA, A, MOORE, R, SUEYOSHI, T and NEGISHI, M (2003): *Phenobarbital induction of drug/steroid-metabolizing enzymes and nuclear receptor CAR.* Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects 1619(3):239-242

KAMIYAMA, Y, MATSUBARA, T, YOSHINARI, K, NAGATA, K, KAMIMURA, H and YAMAZOE, Y (2007): *Role of human hepatocyte nuclear factor 4alpha in the expression of drug-metabolizing enzymes and transporters in human hepatocytes assessed by use of small interfering RNA.* Drug Metab Pharmacokinet 22(4):287-298

KANNO, Y, AOKI, S, MOCHIZUKI, M, MORI, E, NAKAHAMA, T and INOUE, Y (2005): *Expression of constitutive androstane receptor splice variants in rat liver and lung and their functional properties.* Biol Pharm Bull 28(11):2058-2062

KAWAMOTO, T, SUEYOSHI, T, ZELKO, I, MOORE, R, WASHBURN, K and NEGISHI, M (1999): *Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene.* Mol Cell Biol 19(9):6318-6322

KELLER, H, DREYER, C, MEDIN, J, MAHFOUDI, A, OZATO, K and WAHLI, W (1993): *Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers.* Proc Natl Acad Sci U S A 90(6):2160-2164

KERSTEN, S, SEYDOUX, J, PETERS, JM, GONZALEZ, FJ, DESVERGNE, B and WAHLI, W (1999): *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting.* J Clin Invest 103(11):1489-1498

KHORASANIZADEH, S (2004): *The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation.* Cell 116(2):259-272

KIETZMANN, T, HIRSCH-ERNST, KI, KAHL, GF and JUNGERMANN, K (1999): *Mimicry in primary rat hepatocyte cultures of the in vivo perivenous induction by phenobarbital of cytochrome P-450 2B1 mRNA: role of epidermal growth factor and perivenous oxygen tension.* Mol Pharmacol 56(1):46-53

KIYOSAWA, N, TANAKA, K, HIRAO, J, ITO, K, NIINO, N, SAKUMA, K, KANBORI, M, YAMOTO, T, MANABE, S and MATSUNUMA, N (2004): *Molecular mechanism investigation of phenobarbital-induced serum cholesterol elevation in rat livers by microarray analysis.* Arch Toxicol 78(8):435-442

KLEEMANN, R, GERVOIS, PP, VERSCHUREN, L, STAELS, B, PRINCEN, HM and KOOISTRA, T (2003): *Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NFkappa B-C/EBP-beta complex formation.* Blood 101(2):545-551

KLIEWER, SA, UMESONO, K, NOONAN, DJ, HEYMAN, RA and EVANS, RM (1992): *Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors.* Nature 358(6389):771-774

KLIEWER, SA, SUNDSETH, SS, JONES, SA, BROWN, PJ, WISELY, GB, KOBLE, CS, DEVCHAND, P, WAHLI, W, WILLSON, TM, LENHARD, JM and LEHMANN, JM (1997): *Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma.* Proc Natl Acad Sci U S A 94(9):4318-4323

- KOCAREK, TA, SHENOY, SD, MERCER-HAINES, NA and RUNGE-MORRIS, M (2002):** *Use of dominant negative nuclear receptors to study xenobiotic- inducible gene expression in primary cultured hepatocytes.* J. Pharmacol. Toxicol. Methods 47(3):177-187
- KROETZ, DL, YOOK, P, COSTET, P, BIANCHI, P and PINEAU, T (1998):** *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha controls the hepatic CYP4A induction adaptive response to starvation and diabetes.* J Biol Chem 273(47):31581-31589
- KROLL, B, KUNZ, S, KLEIN, T and SCHWARZ, LR (1999):** *Effect of lindane and phenobarbital on cyclooxygenase-2 expression and prostanoid synthesis by Kupffer cells.* Carcinogenesis 20(8):1411-1416
- KUMAR, V, GREEN, S, STAUB, A and CHAMBON, P (1986):** *Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor.* Embo J 5(9):2231-2236
- LAMBA, JK, LAMBA, V, YASUDA, K, LIN, YS, ASSEM, M, THOMPSON, E, STROM, S and SCHUETZ, E (2004):** *Expression of constitutive androstane receptor splice variants in human tissues and their functional consequences.* J Pharmacol Exp Ther 311(2):811-821
- LARSEN, PJ, JENSEN, PB, SORENSEN, RV, LARSEN, LK, VRANG, N, WULFF, EM and WASSERMANN, K (2003):** *Differential influences of peroxisome proliferator-activated receptors gamma and -alpha on food intake and energy homeostasis.* Diabetes 52(9):2249-2259
- LAUDET, V (1997):** *Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor.* J Mol Endocrinol 19(3):207-226
- LAZENNEC, G, CANAPLE, L, SAUGY, D and WAHLI, W (2000):** *Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators.* Mol Endocrinol 14(12):1962-1975
- LEE, SS, PINEAU, T, DRAGO, J, LEE, EJ, OWENS, JW, KROETZ, DL, FERNANDEZ-SALGUERO, PM, WESTPHAL, H and GONZALEZ, FJ (1995):** *Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators.* Mol Cell Biol 15(6):3012-3022
- LEMBERGER, T, STAELS, B, SALADIN, R, DESVERGNE, B, AUWERX, J and WAHLI, W (1994):** *Regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene by glucocorticoids.* J Biol Chem 269(40):24527-24530
- LEMBERGER, T, SALADIN, R, VAZQUEZ, M, ASSIMACOPOULOS, F, STAELS, B, DESVERGNE, B, WAHLI, W and AUWERX, J (1996):** *Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm.* J Biol Chem 271(3):1764-1769
- LIN, Q, RUUSKA, SE, SHAW, NS, DONG, D and NOY, N (1999):** *Ligand selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha.* Biochemistry 38(1):185-190
- LU, R, KANAI, N, BAO, Y and SCHUSTER, VL (1996):** *Cloning, in vitro expression, and tissue distribution of a human prostaglandin transporter cDNA(hPGT).* J Clin Invest 98(5):1142-1149
- LUISI, BF, XU, WX, OTWINOWSKI, Z, FREDMAN, LP, YAMAMOTO, KR and SIGLER, PB (1991):** *Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA.* Nature 352(6335):497-505

- MAGENHEIM, J, HERTZ, R, BERMAN, I, NOUSBECK, J and BAR-TANA, J (2005):** *Negative autoregulation of HNF-4alpha gene expression by HNF-4alpha1.* Biochem J 388(Pt 1):325-332
- MAGLICH, JM, STOLTZ, CM, GOODWIN, B, HAWKINS-BROWN, D, MOORE, JT and KLEWER, SA (2002):** *Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification.* Mol Pharmacol 62(3):638-646
- MAGLICH, JM, WATSON, J, McMILLEN, PJ, GOODWIN, B, WILLSON, TM and MOORE, JT (2004):** *The nuclear receptor CAR is a regulator of thyroid hormone metabolism during caloric restriction.* J Biol Chem 279(19):19832-19838
- MANDARD, S, MULLER, M and KERSTEN, S (2004):** *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes.* Cell Mol Life Sci 61(4):393-416
- MARC, N, GALISTEO, M, LAGADIC-GOSSMANN, D, FAUTREL, A, JOANNARD, F, GUILLOUZO, A and CORCOS, L (2000):** *Regulation of phenobarbital induction of the cytochrome P450 2b9/10 genes in primary mouse hepatocyte culture. Involvement of calcium- and cAMP-dependent pathways.* Eur J Biochem 267(4):963-970
- MARRAPODI, M and CHIANG, JY (2000):** *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and agonist inhibit cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription.* J Lipid Res 41(4):514-520
- MARTIN, PG, GUILLOU, H, LASSERRE, F, DEJEAN, S, LAN, A, PASCUSI, JM, SANCRISTOBAL, M, LEGRAND, P, BESSE, P and PINEAU, T (2007):** *Novel aspects of PPARalpha-mediated regulation of lipid and xenobiotic metabolism revealed through a nutrigenomic study.* Hepatology 45(3):767-777
- MATSUMURA, S and OMURA, T (1973):** *Stability of messenger RNA's for microsomal NADPH-cytochrome c reductase and cytochrome b 5 in the livers of normal and phenobarbital-treated rats.* J Biochem (Tokyo) 73(2):407-416
- MEYER, RP, HAGEMeyer, CE, KNOTH, R, KAUFMANN, MR and VOLK, B (2006):** *Anti-epileptic drug phenytoin enhances androgen metabolism and androgen receptor expression in murine hippocampus.* J Neurochem 96(2):460-472
- MIAO, J, FANG, S, BAE, Y and KEMPER, JK (2006):** *Functional inhibitory cross-talk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1alpha.* J Biol Chem 281(21):14537-14546
- MIN, G, KEMPER, JK and KEMPER, B (2002):** *Glucocorticoid receptor-interacting protein 1 mediates ligand-independent nuclear translocation and activation of constitutive androstane receptor in vivo.* J Biol Chem 277(29):26356-26363
- MISAKI, N, HIGUCHI, H, YAMAGATA, K and MIKI, N (1992):** *Identification of glucocorticoid responsive elements (GREs) at far upstream of rat NPY gene.* Neurochem Int 21(2):185-189
- MITRO, N, MAK, PA, VARGAS, L, GODIO, C, HAMPTON, E, MOLTENI, V, KREUSCH, A and SAEZ, E (2007):** *The nuclear receptor LXR is a glucose sensor.* Nature 445(7124):219-223

- MUANGMOONCHAI, R, SMIRLIS, D, WONG, SC, EDWARDS, M, PHILLIPS, IR and SHEPHARD, EA (2001):** *Xenobiotic induction of cytochrome P4502B1 (CYP2B1) is mediated by the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (CAR) and requires steroid co-activator 1 (SRC-1) and the transcription factor Sp1.* *Biochem. J.* 355(71-78)
- NEBERT, DW, ADESNIK, M, COON, MJ, ESTABROOK, RW, GONZALEZ, FJ, GUENGERICH, FP, GUNSALUS, IC, JOHNSON, EF, KEMPER, B, LEVIN, W and ET AL. (1987):** *The P450 gene superfamily: recommended nomenclature.* *DNA* 6(1):1-11
- NETTLES, KW and GREENE, GL (2005):** *Ligand control of coregulator recruitment to nuclear receptors.* *Annu Rev Physiol* 67(309-333)
- OINONEN, T and LINDROS, KO (1998):** *Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation.* *Biochem J* 329 (Pt 1)(17-35)
- OMURA, T, SATO, R, COOPER, DY, ROSENTHAL, O and ESTABROOK, RW (1965):** *Function of cytochrome P-450 of microsomes.* *Fed Proc* 24(5):1181-1189
- PALMER, CN, HSU, MH, GRIFFIN, KJ, RAUCY, JL and JOHNSON, EF (1998):** *Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver.* *Mol Pharmacol* 53(1):14-22
- PASCUSSI, JM, BUSSON-LE CONIAT, M, MAUREL, P and VILAREM, MJ (2003):** *Transcriptional analysis of the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (NR1I3) gene promoter: Identification of a distal glucocorticoid response element.* *Molecular Endocrinology* 17(1):42-55
- PASCUSSI, JM, DROCOURT, L, GERBAL-CHALOIN, S, FABRE, JM, MAUREL, P and VILAREM, MJ (2001):** *Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes - Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor.* *European Journal of Biochemistry* 268(24):6346-6357
- PASCUSSI, JM, GERBAL-CHALOIN, S, PICHARD-GARCIA, L, DAUJAT, M, FABRE, JM, MAUREL, P and VILAREM, MJ (2000):** *Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor in primary human hepatocytes.* *Biochem Biophys Res Commun* 274(3):707-713
- PASS, GJ, BECKER, W, KLUGE, R, LINNARTZ, K, PLUM, L, GIESEN, K and JOOST, HG (2002):** *Effect of hyperinsulinemia and type 2 diabetes-like hyperglycemia on expression of hepatic cytochrome p450 and glutathione s-transferase isoforms in a New Zealand obese-derived mouse backcross population.* *J Pharmacol Exp Ther* 302(2):442-450
- PATEL, DD, KNIGHT, BL, SOUTAR, AK, GIBBONS, GF and WADE, DP (2000):** *The effect of peroxisome-proliferator-activated receptor-alpha on the activity of the cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene.* *Biochem J* 351 Pt 3(747-753)
- PATSOURIS, D, MANDARD, S, VOSHOL, PJ, ESCHER, P, TAN, NS, HAVEKES, LM, KOENIG, W, MARZ, W, TAFURI, S, WAHLI, W, MULLER, M and KERSTEN, S (2004):** *PPARalpha governs glycerol metabolism.* *J Clin Invest* 114(1):94-103
- PAWAR, A and JUMP, DB (2003):** *Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in rat primary hepatocytes.* *J Biol Chem* 278(38):35931-35939
- PAWAR, A, BOTOLIN, D, MANGELSDORF, DJ and JUMP, DB (2003):** *The role of liver X receptor-alpha in the fatty acid regulation of hepatic gene expression.* *J Biol Chem* 278(42):40736-40743

PERKINS, TJ, HALLETT, M and GLASS, L (2004): *Inferring models of gene expression dynamics.* J Theor Biol 230(3):289-299

PETRESCU, AD, HERTZ, R, BAR-TANA, J, SCHROEDER, F and KIER, AB (2005): *Role of regulatory F-domain in hepatocyte nuclear factor-4alpha ligand specificity.* J Biol Chem 280(17):16714-16727

PINEDA TORRA, I, JAMSHIDI, Y, FLAVELL, DM, FRUCHART, JC and STAELS, B (2002): *Characterization of the human PPARalpha promoter: identification of a functional nuclear receptor response element.* Mol Endocrinol 16(5):1013-1028

PINEDA TORRA, I, CLAUDEL, T, DUVAL, C, KOSYKH, V, FRUCHART, JC and STAELS, B (2003): *Bile acids induce the expression of the human peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene via activation of the farnesoid X receptor.* Mol Endocrinol 17(2):259-272

PRATT, WB and TOFT, DO (1997): *Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones.* Endocr Rev 18(3):306-360

QATANANI, M, WEI, P and MOORE, DD (2004): *Alterations in the distribution and orexigenic effects of dexamethasone in CAR-null mice.* Pharmacol Biochem Behav 78(2):285-291

QATANANI, M, ZHANG, J and MOORE, DD (2005): *Role of the constitutive androstane receptor in xenobiotic-induced thyroid hormone metabolism.* Endocrinology 146(3):995-1002

RASTINEJAD, F, PERLMANN, T, EVANS, RM and SIGLER, PB (1995): *Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats.* Nature 375(6528):203-211

RENCUREL, F, FORETZ, M, KAUFMANN, MR, STROKA, D, LOOSER, R, LECLERC, I, DA SILVA XAVIER, G, RUTTER, GA, VIOLLET, B and MEYER, UA (2006): *Stimulation of AMP-Activated Protein Kinase Is Essential for the Induction of Drug Metabolizing Enzymes by Phenobarbital in Human and Mouse Liver.* Mol Pharmacol 70(6):1925-1934

ROBERTS, AG and ELDER, GH (2001): *Alternative splicing and tissue-specific transcription of human and rodent ubiquitous 5-aminolevulinic synthase (ALAS1) genes.* Biochim Biophys Acta 1518(1-2):95-105

ROEDER, RG (2005): *Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells.* FEBS Lett 579(4):909-915

ROSENBROCK, H, HAGEMEYER, CE, SINGEC, I, KNOTH, R and VOLK, B (1999): *Testosterone metabolism in rat brain is differentially enhanced by phenytoin-inducible cytochrome P450 isoforms.* J Neuroendocrinol 11(8):597-604

RYAN, DE, THOMAS, PE and LEVIN, W (1982): *Purification and characterization of a minor form of hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with polychlorinated biphenyls.* Arch Biochem Biophys 216(1):272-288

SCHROEDER, F, HUANG, H, HOSTETLER, HA, PETRESCU, AD, HERTZ, R, BAR-TANA, J and KIER, AB (2005): *Stability of fatty acyl-coenzyme A thioester ligands of hepatocyte nuclear factor-4alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha.* Lipids 40(6):559-568

SCHUETZ, EG, LI, D, OMIECINSKI, CJ, MULLER-EBERHARD, U, KLEINMAN, HK, ELSWICK, B and GUZELIAN, PS (1988): *Regulation of gene expression in adult rat hepatocytes cultured on a basement membrane matrix.* J Cell Physiol 134(3):309-323

- SCHWABE, JW, FAIRALL, L, CHAPMAN, L, FINCH, JT, DUTNALL, RN and RHODES, D (1993):** *The cocrystal structures of two zinc-stabilized DNA-binding domains illustrate different ways of achieving sequence-specific DNA recognition.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol 58(141-147
- SCRIBNER, KB, ODOM, DP and McGRANE, MM (2007):** *Nuclear receptor binding to the retinoic acid response elements of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in vivo: effects of vitamin A deficiency.* J Nutr Biochem 18(3):206-214
- SHALEV, A, SIEGRIST-KAISER, CA, YEN, PM, WAHLI, W, BURGER, AG, CHIN, WW and MEIER, CA (1996):** *The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin.* Endocrinology 137(10):4499-4502
- SIDHU, JS and OMIECINSKI, CJ (1995):** *Camp-Associated Inhibition of Phenobarbital-Inducible Cytochrome-P450 Gene-Expression in Primary Rat Hepatocyte Cultures.* J Biol Chem 270(21):12762-12773
- SINCLAIR, PR, BEMENT, WJ, HAUGEN, SA, SINCLAIR, JF and GUZELIAN, PS (1990):** *Induction of cytochrome P-450 and 5-aminolevulinic synthase activities in cultured rat hepatocytes.* Cancer Res 50(17):5219-5224
- SOUTHERN, EM (1975):** *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.* J Mol Biol 98(3):503-517
- SQUIRES, EJ, SUEYOSHI, T and NEGISHI, M (2004):** *Cytoplasmic localization of pregnane X receptor and ligand-dependent nuclear translocation in mouse liver.* J Biol Chem 279(47):49307-49314
- STEINEGER, HH, SORENSEN, HN, TUGWOOD, JD, SKREDE, S, SPYDEVOLD, O and GAUTVIK, KM (1994):** *Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of the steady-state mRNA level of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) in hepatic cells. Hormonal modulation of fatty-acid-induced transcription.* Eur J Biochem 225(3):967-974
- SUEYOSHI, T and NEGISHI, M (2001):** *Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors.* Annu Rev Pharmacol Toxicol 41(123-143
- SUEYOSHI, T, KAWAMOTO, T, ZELKO, I, HONKAKOSKI, P and NEGISHI, M (1999):** *The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene.* J Biol Chem 274(10):6043-6046
- SUINO, K, PENG, L, REYNOLDS, R, LI, Y, CHA, JY, REPA, JJ, KLIEWER, SA and Xu, HE (2004):** *The nuclear xenobiotic receptor CAR: structural determinants of constitutive activation and heterodimerization.* Mol Cell 16(6):893-905
- SUWA, Y, MIZUKAMI, Y, SOGAWA, K and FUJII-KURIYAMA, Y (1985):** *Gene structure of a major form of phenobarbital-inducible cytochrome P-450 in rat liver.* J Biol Chem 260(13):7980-7984
- SWALES, K and NEGISHI, M (2004):** *CAR, driving into the future.* Mol Endocrinol 18(7):1589-1598
- SWALES, K, KAKIZAKI, S, YAMAMOTO, Y, INOUE, K, KOBAYASHI, K and NEGISHI, M (2005):** *Novel CAR-mediated mechanism for synergistic activation of two distinct elements within the human cytochrome P450 2B6 gene in HepG2 cells.* J Biol Chem 280(5):3458-3466

- TIRONA, RG, LEE, W, LEAKE, BF, LAN, LB, CLINE, CB, LAMBA, V, PARVIZ, F, DUNCAN, SA, INOUE, Y, GONZALEZ, FJ, SCHUETZ, EG and KIM, RB (2003):** *The orphan nuclear receptor HNF4 alpha determines PXR- and CAR- mediated xenobiotic induction of CYP3A4.* Nat. Med. 9(2):220-224
- TOBIN, KA, STEINEGER, HH, ALBERTI, S, SPYDEVOLD, O, AUWERX, J, GUSTAFSSON, JA and NEBB, HI (2000):** *Cross-talk between fatty acid and cholesterol metabolism mediated by liver X receptor-alpha.* Mol Endocrinol 14(5):741-752
- TRUONG, NT, MONCION, A, BAROUKI, R, BEAUNE, P and DE WAZIERS, I (2005):** *Regulatory sequence responsible for insulin destabilization of cytochrome P450 2B1 (CYP2B1) mRNA.* Biochem J 388(Pt 1):227-235
- UEDA, A, KAKIZAKI, S, NEGISHI, M and SUEYOSHI, T (2002a):** *Residue threonine 350 confers steroid hormone responsiveness to the mouse nuclear orphan receptor CAR.* Mol Pharmacol 61(6):1284-1288
- UEDA, A, HAMADEH, HK, WEBB, HK, YAMAMOTO, Y, SUEYOSHI, T, AFSHARI, CA, LEHMANN, JM and NEGISHI, M (2002b):** *Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital.* Mol Pharmacol 61(1):1-6
- UMESONO, K and EVANS, RM (1989):** *Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors.* Cell 57(7):1139-1146
- VANSELL, NR and KLAASSEN, CD (2002):** *Increase in rat liver UDP-glucuronosyltransferase mRNA by microsomal enzyme inducers that enhance thyroid hormone glucuronidation.* Drug Metab Dispos 30(3):240-246
- VARONE, CL, GIONO, LE, OCHOA, A, ZAKIN, MM and CANEPA, ET (1999):** *Transcriptional regulation of 5-aminolevulinic acid synthase by phenobarbital and cAMP-dependent protein kinase.* Arch Biochem Biophys 372(2):261-270
- WAN, YJY, CAI, Y, LUNGO, W, FU, P, LOCKER, J, FRENCH, S and SUCOV, HM (2000):** *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated pathways are altered in hepatocyte-specific retinoid X receptor alpha-deficient mice.* J Biol Chem 275(36):28285-28290
- WANG, H, CHEN, J, HOLLISTER, K, SOWERS, LC and FORMAN, BM (1999):** *Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR.* Mol Cell 3(5):543-553
- WANG, H, FAUCETTE, S, MOORE, R, SUEYOSHI, T, NEGISHI, M and LECLUYSE, E (2004):** *Human constitutive androstane receptor mediates induction of CYP2B6 gene expression by phenytoin.* J Biol Chem 279(28):29295-29301
- WANG, H, FAUCETTE, S, SUEYOSHI, T, MOORE, R, FERGUSON, S, NEGISHI, M and LECLUYSE, EL (2003):** *A novel distal enhancer module regulated by pregnane X receptor/constitutive androstane receptor is essential for the maximal induction of CYP2B6 gene expression.* J Biol Chem 278(16):14146-14152
- WANG, L, LEE, YK, BUNDMAN, D, HAN, Y, THEVANANTHER, S, KIM, CS, CHUA, SS, WEI, P, HEYMAN, RA, KARIN, M and MOORE, DD (2002):** *Redundant pathways for negative feedback regulation of bile acid production.* Dev Cell 2(6):721-731
- WATT, AJ, GARRISON, WD and DUNCAN, SA (2003):** *HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function.* Hepatology 37(6):1249-1253

- WAXMAN, DJ (1999):** *P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: Central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR.* Archives of Biochemistry and Biophysics 369(1):11-23
- WAXMAN, DJ and AZAROFF, L (1992):** *Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression.* Biochem J 281 (Pt 3)(577-592
- WEI, P, ZHANG, J, EGAN-HAFLEY, M, LIANG, SG and MOORE, DD (2000):** *The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism.* Nature 407(6806):920-923
- WENG, G, YEE, F, MICHL, P, REIS, D and WAHLESTEDT, C (1995):** *Studies on neuropeptide Y receptors in a mouse adrenocortical cell line.* Mol Pharmacol 48(1):9-14
- WIENEKE, N, HIRSCH-ERNST, KI, KUNA, M, KERSTEN, S and PUSCHEL, GP (2007):** *PPARalpha-dependent induction of the energy homeostasis-regulating nuclear receptor NR1i3 (CAR) in rat hepatocytes: Potential role in starvation adaptation.* FEBS Lett 581(29):5617-5626
- WINDSHUGEL, B, JYRKARINNE, J, VANAMO, J, POSO, A, HONKAKOSKI, P and SIPPL, W (2007):** *Comparison of homology models and X-ray structures of the nuclear receptor CAR: assessing the structural basis of constitutive activity.* J Mol Graph Model 25(5):644-657
- WIWI, CA and WAXMAN, DJ (2004):** *Role of hepatocyte nuclear factors in growth hormone-regulated, sexually dimorphic expression of liver cytochromes P450.* Growth Factors 22(2):79-88
- WYDE, ME, BARTOLUCCI, E, UEDA, A, ZHANG, H, YAN, B, NEGISHI, M and You, L (2003):** *The environmental pollutant 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)ethylene induces rat hepatic cytochrome P450 2B and 3A expression through the constitutive androstane receptor and pregnane X receptor.* Mol Pharmacol 64(2):474-481
- XIE, W, YEUEH, MF, RADOMINSKA-PANDYA, A, SAINI, SPS, NEGISHI, Y, BOTTROFF, BS, CABRERA, GY, TUKEY, RH and EVANS, RM (2003):** *Control of steroid, heme, and carcinogen metabolism by nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100(7):4150-4155
- YAMAMOTO, Y, MOORE, R, GOLDSWORTHY, TL, NEGISHI, M and MARONPOT, RR (2004):** *The orphan nuclear receptor constitutive active/androstane receptor is essential for liver tumor promotion by phenobarbital in mice.* Cancer Res 64(20):7197-7200
- YAMAZAKI, K, KUROMITSU, J and TANAKA, I (2002):** *Microarray analysis of gene expression changes in mouse liver induced by peroxisome proliferator- activated receptor alpha agonists.* Biochem Biophys Res Commun 290(3):1114-1122
- YOSHIKAWA, T, IDE, T, SHIMANO, H, YAHAGI, N, AMEMIYA-KUDO, M, MATSUZAKA, T, YATOH, S, KITAMINE, T, OKAZAKI, H, TAMURA, Y, SEKIYA, M, TAKAHASHI, A, HASTY, AH, SATO, R, SONE, H, OSUGA, J, ISHIBASHI, S and YAMADA, N (2003):** *Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling.* Mol Endocrinol 17(7):1240-1254
- YOSHINARI, K, TAKAGI, S, SUGATANI, J and MIWA, M (2006):** *Changes in the expression of cytochromes P450 and nuclear receptors in the liver of genetically diabetic db/db mice.* Biol Pharm Bull 29(8):1634-1638

YOSHINARI, K, KOBAYASHI, K, MOORE, R, KAWAMOTO, T and NEGISHI, M (2003): *Identification of the nuclear receptor CAR:HSP90 complex in mouse liver and recruitment of protein phosphatase 2A in response to phenobarbital.* FEBS Lett 548(1-3):17-20

ZANGAR, RC and NOVAK, RF (1997): *Effects of fatty acids and ketone bodies on cytochromes P450 2B, 4A, and 2E1 expression in primary cultured rat hepatocytes.* Arch Biochem Biophys 337(2):217-224

ZELKO, I, SUEYOSHI, T, KAWAMOTO, T, MOORE, R and NEGISHI, M (2001): *The peptide near the C terminus regulates receptor CAR nuclear translocation induced by xenochemicals in mouse liver.* Mol Cell Biol 21(8):2838-2846

ZHANG, Y, LEE, FY, BARRERA, G, LEE, H, VALES, C, GONZALEZ, FJ, WILLSON, TM and EDWARDS, PA (2006): *Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice.* Proc Natl Acad Sci U S A 103(4):1006-1011

ZHONG, W, MIRKOVITCH, J and DARNELL, JE, JR. (1994): *Tissue-specific regulation of mouse hepatocyte nuclear factor 4 expression.* Mol Cell Biol 14(11):7276-7284

-2650 bis +29 bp des CYP2B1-Promotorbereichs wurden über die *NheI*-Schnittstelle der *multi cloning site* in pGL3 einkloniert .

pGL3C2B1

NheI

actagc AGGTTCCCAACCATTGGCCTACGAATTCATAAACTCATTGTTTTGATAGCTGAG
 -2650
 TAATATTCCATTGTGTAGATGTACCACATTTTCTGTATCCATTCTCTGTTGAAGGGGATC
 TGGGTTCTTTCCATTTTCTGGCTATTATAAATAAGGCTGCGATGAACATAGTGGAGCACG
 TGTCTCTTTTATATGTTGAGGCATCTTTTGGGTATATGCCCAAGAGAGGTATAGCTGGAT
 CCTCAGGCAGTTCAATGTCCAATTTTCTGAGGAACCTCCAGACTGATTTCCAGAATGGTT
 TTACCAGTGGCCGCACCCTTCTTATGATGTTCCAGCCAATGCCTTTCTGGATCGTGGACA
 CAACCTTGAAGAAGTGCACCTCAGTGACCTAGGGGGAAGGTCAGAAAACCATGGTGATT
 TCAGGCACAGAC **PBREM: NR1** **NF1** **NR2**
TCTGTACTTTCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGACTGA
CACCAGGACCTTGCTCCTGCCAGGCTGGGTGATCTGGCACTGAAGTCCAGCTCAGGGT
 TCCCATTGGGAGCCATGAAGTGCATTCCATGCAGGAAGTGGTGCAGTCTTCACATTTTG
 GAGAGGTATATTGCCTTCACCTATTAATAGACAGAAGTACAGAGAGGTTAAGAGCATTTT
 CTAAGGTCATACGGTGGATTAGAACTACAATGCACACATGATAGCTACTTTCTAAACATG
 ACCATCAAGTCCTTGAAATGTTCCAGATGTGGTAGCACATATCTGTAGTCCCAGCAGTG
 GACAGGCCAGAGGAGAACATTATAAATTCAAGGCCAGCCTGGGATATATAGGGAGACC
 TTGTCTAAGACAAACAGATGAAGAGTCCAACCAATGCATTTAAAATGTTTGATGGTTTGA
 ACCTATTTACTTCAGAAGTTGAGGCAAGTTGACCTCAAGTTAAAGGCCAGTCTGAGCTG
 TAAAGGGAGACCCAGAACAGATAGTTGAATATGGTATCACGAACCTGTAATTCTTACACT
 TGGGAGGTAGAGGCAGAAGGACCAGGAGTTCAAAGCTAACCTGTGATACAAAGCAACT
 GAGAAGAAGGATTTATTTTTCTTAGTTTCATTGCAGGGGAGGTATGACATTTGGGGCTT
 TGGTCTAGATGTGGGAGCTTGTGGTTGTTTCTCTATATGGCGGATGGAAGAAGGAGGAC
 GAAGAGGATATATGTTTATATGTAGTGGAGTTGTGACTCATTAGGTTGATCAACAATCTG
 CTTCTTTCTTGCAAGCTTTTCTCTAAGTGTCTGCACCCCCCACCCTAATAATATCAG
 TTAGGGTACAAAGTGTGAAACATGAACTTCTGAGACAGATTTACATTCAAATAGAACA
 CATTATGAATAGATTAATGTTATCACTGTAGTGGTGGGCTGGTGAAGAATGTTCAATTCC
 TTTTAGCAAGATGGGAGGTCAGAGAACTTCTGTGCTATGAACAAATCAGAAGGATGAA

GGGAACCATTTGTCATTAGACACAGTGTTTCAGAGACTATCTTTGTTAGGTTCACTATTTTC
TGTGATAAAACCTCACAGCAGAAAGCAACTTGGGGAAAAGGGTTTATTTTGCTTGCACCTT
TACAGTTTGTCAAACAAGGAAGTCAGGGCAGGATGACAAGGCAGGACCTCGGAGGCAG
GAGCTGATGCAGAGGCCATGGAGGGATGCTTCTCACTGACTTGCTCATTAGGGCTTGC
TCAGCCTGATTTCTTACAGAACCCAAGACTTTCTTACAGAAGTCCAGGGGTGGAATTTCC
CACAGTGGGTGGTGCCCTCCCTCATGCAAACACTAATTAAGAAAATGCTCTTCAGGCTT
GCGTGTAGTGTGATCTTATGGATCCATTTTCTCAATTCAAGTTCTCTCCTCTCAAATGACT
CTAGCTTGTATCATGTTGACACAAAAGTTAGCTAACCCAGAGACCCAGGGGCCCAACT
GCTTCTCTGCCAGGTTTCAGCCTCTCTCTCCATTTGACTCCTGAGCCTCCCTGCTCCTG
AATCTCTTGCCCTTTCCTTTCTTTTCTCTGCATTCTCCCATCTCTGGCTACCATGGGCCA
GAGAGTAAAATGGGGACT *Pst* ctgcagAAATTGCATTTGTAGACTTTTCAAAGACAGGGACAGG
GAACCAACAGACGGAGACAAGCACAGGATCATGGGATACTATTCTTGTCAACTCAAACA
TAATCACATGTACCCAGGACACAAAGAACAACACAGAGAAGCCTCCATAATTTAAGATTAT
ACATGTAAATACACCCTAGACATGCAAGAATAGACCACCCAGTGCATCTAGACTCAGAC
AAAGAAATATACATCTGTACGTTTATATCAGAAATGATCTTTCACATAGAAAAAGCATATA
OARE
GCGTGC ACGCACACACACAATCCCATGCCCTAGTAAGTAAACAGAGCTGACAAAAC **TGA**
ER4
GCTGACAAGTGCACACCCATCCCCATAAAACAAGAGGCCTAAGTCCCAGTGCCCTTTTG
TCCTGTGTATCTGTTTCGTGGTGCCTTGCCAACATCTATGGTGTGGGTAAGGGAATGA
GGAGTGAATAGCTAAAGCAGGAGGCGTGAACATCTGAAGTTGCATAACTGAGTGGAGG
GGCGGATTCAGCATAAAAGATCCTGCTGGAGAGCATGCACTGAAGTCTACCGTGGTTAC
ACCAGGA *Nhe* octaacCCGGGCTCGAGATCTGCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATG
+29 +Luc

pGL3CD2***Nhe*I**

actagcAGGTTCCCAACCATTTGGCCTACGAATTTCATAAACTCATTGTTTTTGATAGCTGAG
 -2650
 TAATATTCCATTGTGTAGATGTACCACATTTTCTGTATCCATTCCCTCTGTTGAAGGGGATC
 TGGGTTCTTTCCATTTTCTGGCTATTATAAATAAGGCTGCGATGAACATAGTGGAGCACG
 TGTCTCTTTTATATGTTGAGGCATCTTTGGGTATATGCCCAAGAGAGGTATAGCTGGAT
 CCTCAGGCAGTTCAATGTCCAATTTTCTGAGGAACCTCCAGACTGATTTCCAGAATGGTT
 TTACCAGTGGCCGCACCCTTCTTATGATGTTTCAGCCAATGCCTTTCTGGATCGTGGACA
 CAACCTTGAAGAAGTGCACCTCAGTGACCTAGGGGGAAGGTCAGAAAACCATGGTGATT
 TCAGGCACAGAC**PBREM: NR1** **NF1** **NR2**
TCTGTACTTTCTTGACCTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGACTGA
CACCAGGACCTTGCTCCTGCCAGGCTGGGTGATCTGGCACTGAAGTCCAGCTCAGGGT
 TCCATTGGGAGCCATGAAGTGCATTCCATGCAGGAAGTGGTGCAGTCTTCACATTTTG
 GAGAGGTATATTGCCTTCACCTATTAATAGACAGAAGTACAGAGAGGTTAAGAGCATTTT
 CTAAGGTCATACGGTGGATTAGAACTACAATGCACACATGATAGCTACTTTCTAAACATG
 ACCATCAAGTCCTTGAAATGTTCCAGATGTGGTAGCACATATCTGTAGTCCCAGCAGTG
 GACAGGCCAGAGGAGAACATTATAAATTCAAGGCCAGCCTGGGATATATAGGGAGACC
 TTGTCTAAGACAAACAGATGAAGAGTCCAACCAATGCATTTAAAATGTTTGATGGTTTGA
 ACCTATTTACTTCAGAAGTTGAGGCAAGTTGACCTCAAGTTAAAGGCCAGTCTGAGCTG
 TAAAGGGAGACCCAGAACAGATAGTTGAATATGGTATCACGAACCTGTAATTCTTACACT
 TGGGAGGTAGAGGCAGAAGGACCAGGAGTTCAAAGCTAACCTGTGATACAAAGCAACT
 GAGAAGAAGGATTTATTTTTTCTTAGTTTCATTGCAGGGGAGGTATGACATTTGGGGCTT
 TGGTCTAGATGTGGGAGCTTGTGGTTGTTTCTCTATATGGCGGATGGAAGAAGGAGGAC
 GAAGAGGATATATGTTTATATGTAGTGGAGTTGTGACTCATTAGGTTGATCAACAATCTG
 CTTCTTTCTTGCAAGCTTTTCTCTAAGTGTCTGCACCCCCCACCCAATAATATCAG
 TTAGGGTACAAAGTGTTGAAACATGAACTTCTGAGACAGATTTCACATTCAAATAGAACA
 CATTATGAATAGATTAATGTTATCACTGTAGTGGTGGGCTGGTGAAGAATGTTCAATTCC
 TTTTAGCAAGATGGGAGGTCAGAGAACTTCTGTGCTATGAACAAATCAGAAGGATGAA
 GGGAACCATTTGTCATTAGACACAGTGTTTCAGAGACTATCTTTGTTAGGTTCACTATTTT
 TGTGATAAAACCTCACAGCAGAAAGCAACTTGGGGAAAAGGGTTTATTTTGCTTGCACCTT

TACAGTTTGTCAAACAAGGAAGTCAGGGCAGGATGACAAGGCAGGACCTCGGAGGCAG
 GAGCTGATGCAGAGGCCATGGAGGGATGCTTCTCACTGACTTGCTCATTAGGGCTTGC
 TCAGCCTGATTTCTTACAGAACCCAAGACTTTCTTACAGAAGTCCAGGGGTGGAATTTCC
 CACAGTGGGTGGTGCCCTCCCTCATGCAAACACTAATTAAGAAAATGCTCTTCAGGCTT
 GCGTGTAGTGTGATCTTATGGATCCATTTTCTCAATTCAAGTTCTCTCCTCTCAAATGACT
 CTAGCTTGTATCATGTTGACACAAAAGTTAGCTAACCCAGAGACCCAGGGGCCCAACT
 GCTTCTCTGCCAGGTTTCAGCCTCTCTCTCCATTTGACTCCTGAGCCTCCCTGCTCCTG
 AATCTCTTGCCTTTCCTTTCTTTTCTCTGCATTCTCCCATCTCTGGCTACCATGGGCCA
 GAGAGTAAAATGGGGACT ***Pst*** *ctgcaq* AAAATTGCATTTGTAGACTTTTCAAAGACAGGGACAGG
 GAACCAACAGACGGAGACAAGCACAGGATCATGGGATACTATTCTTGTCAACTCAAACA
 TAATCACATGTACCCAGGACACAAAGAACATACAGAGAAGCCTCCATAATTTAAGATTAT
 ACATGTAAATACACCCTAGACATGCAAGAATAGACCACC ***EcoRI*** *gaattcaatt* CTAAGTCCCAGTGC
 CCTTTTGTCTGTGTATCTGTTTCGTGGTGTCTTGCCAACATCTATGGTGTGGGTAAGG
 GAATGAGGAGTGAATAGCTAAAGCAGGAGGCGTGAACATCTGAAGTTGCATAACTGAGT
 GGAGGGGCGGATTCAGCATAAAAGATCCTGCTGGAGAGCATGCACTGAAGTCTACCGT
 GGTTACACCAGGA ***Nhe I*** *actaac* CCGGGCTCGAGATCTGCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCC
 +29
 ACCATG
 +Luc

TCTCCCATCTCTGGCTACCATGGGCCAGAGAGTGAAATGGGGACT *Pst* I *ctgcaq* AAATTGCATT
 TGTAGACTTTTCAAAGACAGGGACAGGGAACCAACAGACGGAGACAAGCACAGGATCA
 TGGGATACTATTCTTGTCAACTCAAACATAATCACATGTACCCAGGACACAAAGAACATA
 CAGAGAAGCCTCCATAATTTAAGATTATACATGTAAATACACCCTAGACATGCAAGAATA
 GACCACCCAGTGCATCTAGACTCAGACAAAGAAATATACATCTGTACGTTTATATCAGAA
PPRE **OARE**
ATGATCTTTACATAGAAAAGCATATAGCGTGCACGCACACACAATCCCATGCCCTA
ER4
GTAAGTAAACAGAGCTGACAAAACTGAGCTGACAAGTGCA CACCCATCCCCATAAAACA
AGAGGCCTAAGTCCCAGTGCCCTTTTGTCTGTGTATCTGTTTCGTGGTGTCCCTTGCCA
 ACATCTATGGTGTGGGTAAGGGAATGAGGAGTGAATAGCTAAAGCAGGAGGCGTGAAC
 ATCTGAAGTTGCATAACTGAGTGGAGGGGCGGATTCAGCATAAAAGATCCTGCTGGAGA
 GCATGCACTGAAGTCTACCGTGGTTACACCAGGA *Nhe* I (multi cloning site)
gctagc CCGGGCTCGAGATCTGCGATCTAAGTAAG
 +29
 CTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATG
 +Luc

Die Deletionskonstrukte pGL3CD2A-D unterscheiden sich nur im proximalen Bereich des Promotors von -354 bis -175 bp vom Wildtyp-Konstrukt pGL3C2B1

pGL3CD2A

Pst I

...GAAATGGGGACT *ctgcaq* AAATTGCATTTGTAGACTTTTCAAAGACAGGGACAGG
 -566
 GAACCAACAGACGGAGACAAGCACAGGATCATGGGATACTATTCTTGTCAACTCAAACA
 TAATCACATGTACCCAGGACACAAAGAACATACAGAGAAGCCTCCATAATTTAAGATTAT
 ACATGTAAATACACCCTAGACATGCAAGAATAGACCACCGACCACCCAGTGCATCTAGA
 CTCAGACAAAGAAATATACATCTGTACGTTTATATCAGAAATGATCTTTCACATAGAAAAA
 GCATATAGCGTGC *ACGCACgaattcaatt* CTAAGTCCCAGTGCCCTTTTGTCTGTGTATCT
 -261 -175
 GTTTCGTGGTGTCTTGGCCAACATCTATGGTGTGGGTAAGGGAATGAGGAGTGAATAGC
 TAAAGCAGGAGGCGTGAACATCTGAAGTTCATAACTGAGTGGAGGGGCGGATTTCAGC
 ATAAAAGATCCTGCTGGAGAGCATGCACTGAAGTCTACCGTGGTTACACCAGGA *actaacCC*
Bgl II (multi cloning site) *Nhe I* +29
 GGGCTCG *agatc* GCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATG
 +Luc

pGL3CD2B

Pst I

...GAAATGGGGACT *ctgcaq* AAATTGCATTTGTAGACTTTTCAAAGACAGGGACAGG
 -566
 GAACCAACAGACGGAGACAAGCACAGGATCATGGGATACTATTCTTGTCAACTCAAACA
 TAATCACATGTACCCAGGACACAAAGAACATACAGAGAAGCCTCCATAATTTAAGATTAT
 ACATGTAAATACACCCTAGACATGCAAGAATAGACCACCGACCACCCAGTGCATCTAGA
 CTCAGACAAAGAAATATACATCTGTACGTTTATATCAGAAATGATCTTTCACATAGAAAAA
 GCATATAGCGTGC *ACGCACACACAAT* CCCATGCCCTAGTAAG *gaattcaatt* CTAAGTCC
 OARE *EcoRI*
 -236 -175
 CAGTGCCCTTTTGTCTGTGTATCTGTTTCGTGGTGTCTTGGCCAACATCTATGGTGTGG
 GTAAGGGAATGAGGAGTGAATAGCTAAAGCAGGAGGCGTGAACATCTGAAGTTCATA
 ACTGAGTGGAGGGGCGGATTTCAGCATAAAAGATCCTGCTGGAGAGCATGCACTGAAGT
 CTACCGTGGTTACACCAGGA *actaacCCGGGCTCGagatc* GCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGG
Nhe I *Bgl II* (multi cloning site)
 TAAAGCCACCATG
 +Luc

pGL3CD2C

Pst I

...GAAATGGGGACT *ctgcaq* AAATTGCATTTGTAGACTTTTCAAAGACAGGGACAGG
 -566
 GAACCAACAGACGGAGACAAGCACAGGATCATGGGATACTATTCTTGTCAACTCAAACA
 TAATCACATGTACCCAGGACACAAAGAACATACAGAGAAGCCTCCATAATTTAAGATTAT
 ACATGTAAATACACCCTAGACATGCAAGAATAGACCACCGACCACC *gaattc* CTAGTAAGT
EcoRI
ER4 -354 -243
AAACAGAGCTGACAAAAC **TGAGCTGACAAGTGCA** CACCCATCCCCATAAAACAAGAGG
CCTAAGTCCCAGTGCCCTTTTGTCTGTGTATCTGTTTCGTGGTGTCTTGCCAACATCT
 ATGGTGTGGGTAAGGGAATGAGGAGTGAATAGCTAAAGCAGGAGGCGTGAACATCTGA
 AGTTGCATAACTGAGTGGAGGGGCGGATTGAGCATAAAAGATCCTGCTGGAGAGCATG
 CACTGAAGTCTACCGTGGTTACACCAGGA *Nhe* I *Bgl* II (multi cloning site)
gctagc CCGGGCTC*gagatc* GCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCC
 +29
 CCGTACTGTTGGTAAAGCCACCATG
 +Luc

pGL3CD2D

Pst I

...GAAATGGGGACT *ctgcaq* AAATTGCATTTGTAGACTTTTCAAAGACAGGGACAGG
 -566
 GAACCAACAGACGGAGACAAGCACAGGATCATGGGATACTATTCTTGTCAACTCAAACA
 TAATCACATGTACCCAGGACACAAAGAACATACAGAGAAGCCTCCATAATTTAAGATTAT
 ACATGTAAATACACCCTAGACATGCAAGAATAGACCACCGACCACC *gaattc* GCATATAGC
EcoRI
OARE -354 -279
GTGC **ACGCACACACAAT** CCCATGCCCTAGTAAGTAAACAGAGCTGACAAAAC **TGAGC**
ER4
TGACAAGTGCA CACCCATCCCCATAAAACAAGAGGCCTAAGTCCCAGTGCCCTTTTGTCT
 CTGTGTATCTGTTTCGTGGTGTCTTGCCAACATCTATGGTGTGGGTAAGGGAATGAGG
 AGTGAATAGCTAAAGCAGGAGGCGTGAACATCTGAAGTTGCATAACTGAGTGGAGGGG
 CGGATTCAGCATAAAAGATCCTGCTGGAGAGCATGCACTGAAGTCTACCGTGGTTACAC
 CAGGA *Nhe* I *Bgl* II (multi cloning site)
gctagc CCGGGCTC*gagatc* GCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATG
 +29
 +Luc

pGL3CD2E

...GAAATGGGGACT *Pst*I **ctgcag**AAATTGCATTTGTAGACTTTTCAAAGACAGGGACAGG
 -566
 GAACCAACAGACGGAGACAAGCACAGGATCATGGGATACTATTCTTGTCAACTCAAACA
 TAATCACATGTACCCAGGACACAAAGAACATACAGAGAAGCCTCCATAATTTAAGATTAT
 ACATGTAAATACACCCTAGACATGCAAGAATAGACCACCGACCACCCAGTGCATCTAGA
 CTCAGACAAAGAAATATACATCTGTACGTTTATATCAGAAATGATCTTTCACATAGAAAA
PPRE
 GCATATAGCGTGC *Eco*R I **ACGCACgaattc**CTAGTAAGTAAACAGAGCTGACAAAAC**TGAGCTGA**
 ER4
 -261 -243
CAAGTGACACCCATCCCCATAAAACAAGAGGCCTAAGTCCCAGTGCCCTTTTGTCTG
 TGTATCTGTTTCGTGGTGTCTTGCCAACATCTATGGTGTGGGTAAGGGAATGAGGAGT
 GAATAGCTAAAGCAGGAGGCGTGAACATCTGAAGTTGCATAACTGAGTGGAGGGGCGG
 ATTCAGCATAAAAGATCCTGCTGGAGAGCATGCACTGAAGTCTACCGTGGTTACACCAG
*Nhe*I *Bgl* II (multi cloning site)
 GA **actaac**CCGGGCTCG**gaatc**GCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATG
 +29 **+Luc**

pGL3C2B1_PPPE_mut

.....GAAATGGGGACT *Pst* I *ctgcag* AAATTGCATTTGTAGACTTTTCAAAGACAGGGACAGG
 -566
 GAACCAACAGACGGAGACAAGCACAGGATCATGGGATACTATTCTTGTCAACTCAAACA
 TAATCACATGTACCCAGGACACAAAGAACATACAGAGAAGCCTCCATAATTTAAGATTAT
 ACATGTAAATACACCCTAGACATGCAAGAATAGACCACCCAGTGCATCTAGACTCAGAC
 AAAGAAATATACATCTGTACGTTTATATCAGAA **PPPE** *ATGATagccCACATAGAAAA* GCATATA
OARE
 GCGTGC *ACGCACACACAAT* CCCATGCCCTAGTAAGTAAACAGAGCTGACAAAAC *TGA*
ER4
GCTGACAAGTGCA CACCCATCCCCATAAAACAAGAGGCCTAAGTCCCAGTGCCCTTTTG
 TCCTGTGTATCTGTTTCGTGGTGCCTTGCCAACATCTATGGTGTGGGTAAGGGAATGA
 GGAGTGAATAGCTAAAGCAGGAGGCGTGAACATCTGAAGTTGCATAACTGAGTGGAGG
 GGCGGATTCAGCATAAAAGATCCTGCTGGAGAGCATGCACTGAAGTCTACCGTGGTTAC
 ACCAGGA *Nhe* I *Bgl* II (multi cloning site) *actagc* CCGGGCTCG *agatc* GCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATG
 +29 +Luc

pGL3C2B1_ER4_mut

.....GAAATGGGGACT *Pst* I *ctgcag* AAATTGCATTTGTAGACTTTTCAAAGACAGGGACAGG
 -566
 GAACCAACAGACGGAGACAAGCACAGGATCATGGGATACTATTCTTGTCAACTCAAACA
 TAATCACATGTACCCAGGACACAAAGAACATACAGAGAAGCCTCCATAATTTAAGATTAT
 ACATGTAAATACACCCTAGACATGCAAGAATAGACCACCCAGTGCATCTAGACTCAGAC
 AAAGAAATATACATCTGTACGTTTATATCAGAA **PPPE** *ATGATCTTTCACATAGAAAA* GCATATA
OARE
 GCGTGC *ACGCACACACAAT* CCCATGCCCTAGTAAGTAAACAGAGCTGACAAAAC *cag*
ER4
GCcGACAttcGCI CACCCATCCCCATAAAACAAGAGGCCTAAGTCCCAGTGCCCTTTTG
 TCCTGTGTATCTGTTTCGTGGTGCCTTGCCAACATCTATGGTGTGGGTAAGGGAATGA
 GGAGTGAATAGCTAAAGCAGGAGGCGTGAACATCTGAAGTTGCATAACTGAGTGGAGG
 GGCGGATTCAGCATAAAAGATCCTGCTGGAGAGCATGCACTGAAGTCTACCGTGGTTAC
 ACCAGGA *Nhe* I *Bgl* II (multi cloning site) *actagc* CCGGGCTCG *agatc* GCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATG
 +29 +Luc

pGL3-Konstrukte des Ratten-CAR-Promotors

Maximal -4279 bis +351 bp des rCAR-Promotorbereichs wurden *blunt-end* (keine exakte Angabe der Spaltstelle vom Hersteller), in der falschen Orientierung in pJet kloniert, über die *Xho I* / *Xba I*-Schnittstellen in der pJet-*multi cloning site* herausgeschnitten und über die *Nhe I* / *Xho I*-Schnittstellen in der pGL3-*multi cloning site* in der richtigen Orientierung in pGL3 einkloniert, die Überhänge von *Xba I* und *Nhe I* sind kompatibel, die *Nhe I* Schnittstelle geht aber verloren.

pGL3rCARprom4,4

~~NheI~~

gctaga...GTATACATGGAACCCCAACAAGCAGTGAGGGAAGGCTTTTGCATTGCAATGCCGT
 -4279
 GCAACACTTTGCTTCCTCACCGGTTTCCACTTTGTAGAGAGAAATGGAGCCAAAGAAGT
 TCTCATGGTATTCCAGTTGATTCTGGCCACTTGCGCTGACTCATGCCCTTTTGGCAGAG
 CTTGTTTTTTCTGTTGGATTGAACCCCACTATGATTCATCTTTGGTGTGGCTATTGAA
 CTGGGCTGCTAGTGTCCCGACAATGAAGAGTGAATCACTCCAAGGAACTACTTCTAAA
 CAGGTTAACACCCTCTTTTCTATTAACCTTCTTTCTNCCCTACCTCTGGTAGGTGGCC
 CAGAAGGGAAAAGTGAGTGAACCTAAACAAAGAGGGTTTTGAAATAAAAATCTAAGCCT
 GCAATAGTGTCTCACTATGTAGCCCAAGCTGGCTTTGAACTCACGTCAGCTCTTGCTTC
 GTCCTCCCAAATATTGAGAATATAAATAGACATCATCATAACCAGCCTAGGAATCCTTGAT
 CTTGACTCCACATATATTTGGTACATATCTTTGTATGTCGGTTTTGTTTGAGACAGGATGT
 CATTCCCAGTCTGACTATGTGGCTGAGGGTCGATTTGAACTCCTGATCACCTGCTTTG
 ACCTGGCCCTTTGTCTCTCAGTTACAGGCACGTTCTACTCCTGTTTTGTTTTTTCAGATG
 GGATGTTGCTGTGTAGCCCAGGCTGTCCTGGGACTCATAGTTCCCTGCCTTGGGCCTC
 ACTACTGCTGGGTTTACAAGTGTGTGCCACCATGCCTGGCACCTGATACATGTGCATGT
 CAACTTAACATAAGCTAGACTCATCCAGAAAGAAGAAAATTCAAATGAGAAAATATCTCC
 ATAAGACTGGCTTGTAGCAGGACTGGAGAGATGGCTCAGCAGTTAAGACCAGTGGCTG
 CTCTTCCAGAGATCCTGAGTTCAATTCCCAGCAACCACATCATGACCCACAATCATTGT
 AATGGGAACTAATGCCCCCTTCTGGTGTGCATGAAGACAGGTAGACTCATATACATAAA
 ATAAACAAAAAAATCTTTTTTAAAAAAATTTAAAAAAGGGTTGGCTTGTAGGCAAGTCTG
 TGGGGCCGTTTTCTTGACTCATGATTATGTGGATGGGTTCCCCTCCCAACCCCGGTGGG

TGATGCTACCCCAGGGCAGTGGCCATAGGTTGTATAAGCAAGCAAGCTAAGGGGTTGG
AAAAACGTCTCATGGGTAAGAGTCTTTAGTGTCCCTGAAGAGGACCATTCCCAGTATGTA
CATGATGGCTCACAACCTGCATGTAAGGCCAGTTCAGAGGATCCAACATCATCTTCTGA
AGTTCATAGACCATGCATACATGTGATACATCTATGCTCATTGAGGTATACGTATGCATA
AAATCAATAATTCTTTTTTTCTTTTTTTGGTTCTTTTTTTTCGGAGCTGGGGACCGAACCC
AGAACCTTGCGCTTCCTAGGCAAGCGCTCTACCACTGAGCTAAATCCCCAACCCCAAAA
TCAATAATTCTTTAAGGCAAGCTAAGCAAGCAATAGAGAGTAAGGCAGTAATCAGAGTTC
CTCTGTGGTCTCTACTTTGACTCCTGCGTCCAGGTTTCTATTTGAGGTATTTCCCTGACT
TCCCTCAATGATGAACTGCGATCAGGATATATAAGGCAAACAAACCCTTTCCTCCCCAG
GTTGCTTTTCGTTGTCGTGTTTATCGCAGTAGCAAGCAAACCTAGAGTAGAATTGGTACTG
GAAGTAGGGTGTTGCTGTGAATGGCTTGGCCATGTCAGAGAGAGGAATGTTAAGAAAG
ATGTAGGGACTTTGAGCTAGAAAAGCTACCGAGCGCTCTGAGCTTATTGATCTACACTT
GTGGGAGGTTAGAAGGTAAGAGTAGGGGTTGGGGATTTAGCTCAGTGGTAGAGTGCTT
GCCTAGCAAGCGCAAGGCCCTGGGTTTCGGTCCCCAGCTCCGAAAAAAGAATAGAAAA
AAAAAAAAAAAAAGAAGGTAAGAGTAACACAAATGATGGAGGCTTTGTGAAATTACAGAG
GGGACCAAGGACTATCAGTGAGGTGGAACTTGTTCTTTGGAGAGTCAGTTGTATTGGA
TGGTGTTTTGCTGGAGCAATCATGTGGAGTGTTCCTGAGGTGGACACAGGTGTGAAA
GACTAAGGCAGACTCGTGTGATGAGTGTCTCACTGAAGCAGACACAGGAGAGAGGATG
TTCTGCTAAAGCAAACACGTGAAAGGACGCGTGATGAAGGATTCTTTGCTAACAACACG
CGTGTATTAGTCCGCCTTACATTGAGTAGTTGAGCTTCGTGGACTGGGGCTGATTTAAT
GCACATGCTAAGGCAAGACCAGTGCTGAGGCAAGGCATATAGAAGACATGCGATGTTT
GGAGGGTATAAATAAGACTCCACAGAGTGATGAAGACAGAGCTTGGTTTGCTGGTACCG
CTAGCTGTGCAACACTTGGGCGTCTCATGTCTTCTCTAATCTTCGCTTCCCTAAGAGAG
GCACAGCTGAGAACTCCTAGTGTTCTGTTGATCCCTCCTGCTCATTGAGCTGAGACT
GAGGCCTGGCTGTCTCTGCTAGGTAGTGTCACTGCTGTAACCTGACTCTAACTGA
TCCGCTGGTGTATCTGTAAAATGTTTGCGGGTGGATCGAGCCGCCACGGCTTAACCTG
TGAACTGAACTGCTGATTTCCAGACAACACAGACAGACAGGAGCTGCTCCAAGAACCT
TTCTAAACAGGCCCACTGCTCCAGTATCCTTTCTTTTCCACAATCTCTGATGGGTGGTGG

GCTACAAGAGATGTTAAAGCATTAAAGAATCATCATTAAAATAAGGTTTAAAAAATTAAA
 GTTATATACCAGGACTGTTCTGTGATATTTTAATAAGAATCTGTAGTTTGGGGCTGGA
 GAGATGGCTCAGCGGTTAAGAGCATTGACTGCTTTTCCAGAGGTCCCGAGTTCAATTCC
 CAACGACCACATGGTGGCTCACGACCATCTATAATGGGATCCGATGCTCTCTTCTGGTG
 TATCCGAAGATAGTGACAGTGTACTCATACATGAAATAAATAAATCTTTAAAAAAGAATCT
 GTAGTTT **Bst XI** ccaattagttgAATAATAAGCTATGATTAACAAGAAACCACTACCCCTGATCTGAG
 CAGCACGGAAGCTCCAGAATAAAGAGAGAAGCTGAGGTTTGACACCAGGTATCAGGGG
 AGGAGCCTGGAGGGGTTTTGTTGTTTTTACATCCCTTTTTGGGCAGGAAAGATGCCAAT
 GAGCCACTGAGTGTGTATAA **DR1 cent** AGGTCAGAGAACA **Pst I** ctgcagGGGCCATGTGGATTCCAG
 GGGTCAAAGAGGTCACCATGCTTGGCAGCAAATGCCTTTACCCACTGTCTTGACACCAA
 CTCCACCTTGGTTTTTTTTGACAGTCTCTCCCGCACTGGAATTCACCAGCTAGGCTAGGC
 TTGTACACCCTGGGGACCCACCTCTCTCTGCCCCCTTGGCATTAGGATTATGAGTTGTC
 TCACTGTGCCTTTTTTTTTTAATGTAGGTTCTAGGAATTGAACTCGGCTCTTCATGCTT
 ACTTTGTGAGCACTTAACAGACGAAGCCATCTCGCCAGCACCTAGAGTTCACCTTTTCT
 CCTATCTCAGTCGCCCTTGTAAAGAAAGTGGGATCTCTTCTAGCTCTACGCCTAAGCTC
 TTAATTAGAATACCAAAGTCTTTTTTAAACAGATCTCTGGGTAAGAGGGGAAAAGCACTC
 TTGCAGAGGATTCTACTTGAAATCCTAGTACCCAACATGCCATCTCACAACCTGCCTAGAA
 CTCTAGCCCCAGAATATCAGACAG **DR1 prox** TGTCCTCTGATCTCTGTGGGTACTAGGTGTACACA
 TTTAAAAAAAATCAGTAAAAAATTAAGAAAGAAAGAAAGAAAATCCTTTGGGAGCCT
 GGTATAATTCTCATTCTTTTACATTTGCAAACCTGCGTGTGAAAAAGCCTGCCATCTCTCC
 TGTCATCTCTCGTTTTATCCAGGATCCATGCACAAAGGAGACTATAGATTTAGCCTACAG
 CTCACCCATAGGGAAAGCTCCCACGAGCCTGCTAAGCGACAGCTTTTAATGAGTCATGA
 GGTCTAGTCCCTCCCCATCTGCTACCAACCAACACTTCTTGGGCATGCTAGGTAACCC
 CCCCCACCCCCACCCCCAAACACACACACC **HNF4-RE** CAGGTCTTTGCCCTGGGTCCAGAGTCTA
 CGTCCTACCTACATATGGCACTGAGACTACCTGGAGGCTCCATGCAAGAGACGTCCCTT
 GTTTTCCAGGCACTGAGGACCACAATCCCTAATTCCTG... **Xho I** ctgcagATCTGOGATCTAAGTAA (multi cloning site)
 +85
 GCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATG
 +Luc

pGL3rCARprom2,6**~~Not~~**

~~Not~~
 cctag...CGCAGTAGCAAGCAAAGCTAGAGTAGAATTGGTACTGGAAGTAGGGTGTGCTGT
 -2536
 GAATGGCTTGGCCATGTCAGAGAGAGGAATGTTAAGAAAGATGTAGGGACTTTGAGCTA
 GAAAAGCTACCGAGCGCTCTGAGCTTATTGATCTACACTTGTGGGAGGTTAGAAGGTAA
 GAGTAGGGGTTGGGGATTTAGCTCAGTGGTAGAGTGCTTGCCTAGCAAGCGCAAGGCC
 CTGGGTTCCGGTCCCCAGCTCCGAAAAAAGAATAGAAAAAAGAAAGGTAA
 GAGTAACACAAATGATGGAGGCTTTGTGAAATTACAGAGGGGACCAAGGACTATCAGTG
 AGGTGGAACTTGTCTTTGGAGAGTCAGTTGTATTGGATGGTGTGTTTGTGCTGGAGCAAT
 CATGTGGAGTGTTCCTGAGGTGGACACAGGTGTGAAAGACTAAGGCAGACTCGTGT
 CATGAGTGTCTCACTGAAGCAGACACAGGAGAGAGGATGTTCTGCTAAAGCAAACACGT
 GAAAGGACGCGTGATGAAGGATTCTTTGCTAACAACACGCGTGATTAGTCCGCCTTAC
 ATTGAGTAGTTGAGCTTCGTGGACTGGGGCTGATTTAATGCACATGCTAAGGCAAGACC
 AGTGCTGAGGCAAGGCATATAGAAGACATGCGATGTTTGGAGGGTATAAATAAGACTCC
 ACAGAGTGATGAAGACAGAGCTTGGTTTGTGGTACCGCTAGCTGTGCAACACTTGGG
 CGTCTCATGTCTTCTAATCTTCGCTTCCCTAAGAGAGGCACAGCTGAGAACTCCTAGT
 GTTCTGTTGATCCCTCCTGCTCATTGAGCTGAGACTGAGGCCTGGCTGTCTCTGCTA
 GGTAGTGCACTGCTGTAACCTGACTCTAACTGATCCGCTGGTGTATCTGTAAAT
 GTTTGCGGGTGGATCGAGCCGCCACGGCTTAACTGTGAACTGAACTGCTGATTTCCA
 GACAACACAGACAGACAGGAGCTGCTCAAAGAACCTTTCTAAACAGGCCCACTGCTCC
 AGTATCCTTTCTTTCCACAATCTCTGATGGGTGGTGGGCTACAAGAGATGTTAAAGCAT
 TTAAGAATCATCATTAAAATAAGGTTTAAAAAATTAAGTTATATACCAGGACTGTTTCGT
 GTGATATTTTAATAAGAATCTGTAGTTTGGGGCTGGAGAGATGGCTCAGCGGTTAAGA
 GCATTGACTGCTTTTCCAGAGGTCCCGAGTTCAATTCCCAACGACCACATGGTGGCTCA
 CGACCATCTATAATGGGATCCGATGCTCTCTTCTGGTGTATCCGAAGATAGTGACAGTG
 TACTCATAACATGAAATAAATAAATCTTTAAAAAAGAATCTGTAGTTTccaattagttggAATAATA
 AGCTATGATTAACAAGAAACCACTACCCCTGATCTGAGCAGCACGGAAGCTCCAGAATA
 AAGAGAGAAGCTGAGGTTTGACACCAGGTATCAGGGGAGGAGCCTGGAGGGGTTTTGT
 TGTTTTACATCCCTTTTTGGGCAGGAAAGATGCCAATGAGCCACTGAGTGTGTATAAAG

DR1 dist**Bst XI**

DR1 cent *Pst* I
GTCAGAGAACAACctgcagGGGCCATGTGGATTCCAGGGGTCAAAGAGGTCACCATGCTT
GGCAGCAAATGCCTTTACCCACTGTCTTGACACCAACTCCACCTTGGTTTTTTTGACAGT
CTCTCCCGCACTGGAATTCACCAGCTAGGCTAGGCTTGTACACCCTGGGGACCCACCT
CTCTCTGCCCCCTTGGCATTAGGATTATGAGTTGTCTCACTGTGCCTTTTTTTTTTTAAT
GTAGGTTCTAGGAATTGAACTCGGCTCTTCATGCTTACTTTGTGAGCACTTAACAGACGA
AGCCATCTCGCCAGCACCTAGAGTTCACCTTTCTCCTATCTCAGTCGCCCCCTGTAAG
AAAGTGGGATCTCTTCTAGCTCTACGCCTAAGCTCTTAATTAGAATACCAAAGTCTTTTTT
AACAGATCTCTGGGTAAGAGGGGAAAAGCACTCTTGCAGAGGATTCTACTTGAAATCC
TAGTACCCAACATGCCATCTCACAAGTGCCTAGAAGTCTAGCCCCAGAATATCAGACAG
DR1 prox
TGTCCTCTGATCTCTGTGGGTACTAGGTGTACACATTTAAAAAAAAAAATCAGTAAAAAAT
TTAAGAAAGAAAGAAAGAAATCCTTTGGGAGCCTGGTATAATTCTCATTCTTTTACATT
GCAAAGTGCCTGTGAAAAAGCCTGCCATCTCTCCTGTCATCTCTCGGTTTATCCAGGAT
CCATGCACAAAGGAGACTATAGATTTAGCCTACAGCTCACCCATAGGGAAAGCTCCAC
GAGCCTGCTAAGCGACAGCTTTTAATGAGTCATGAGGTCCTAGTCCCTCCCCATCTGCT
ACCAACCAACACTTCTTGGGCATGCTAGGTAACCCCCCCCCACCCCCACCCCCAAACACA
HNF4-RE
CACACCCAGGTCTTTGCCCTGGGTCCAGAGTCTACGTCCTACCTACATATGGCACTGAG
ACTACCTGGAGGCTCCATGCAAGAGACGTCCCTTGTTCAGGCACTGAGGACCACAA
Xho I (multi cloning site)
TCCCTAATTCCTG...ctgcagATCTGCGATCTAAGTAAGCTTGGCAATTCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATG
+85 +Luc

pGL3rCARprom1,9

~~Alho~~

~~octaa~~...CAGAGTGATGAAGACAGAGCTTGGTTTGTCTGGTACCGCTAGCTGTGCAACACTT
 -1834
 GGGCGTCTCATGTCTTCTCTAATCTTCGCTTCCCTAAGAGAGGCACAGCTGAGAACTCC
 TAGTGTTCCTGTTGATCCCTCCTGCTCATTGAGCTGAGACTGAGGCCTGGCTGTCTCT
 GCTAGGTAGTGTCACTGCTGTAACCTGACTCTAACTGATCCGCTGGTGTATCTGT
 AAAATGTTTGCGGGTGGATCGAGCCGCCACGGCTDR1 dist
TAACCTGTGAACTGCTGAT
 TTCCAGACAACACAGACAGACAGGAGCTGCTCCAAAGAACCTTTCTAAACAGGCCCACT
 GCTCCAGTATCCTTTCTTTCCACAATCTCTGATGGGTGGTGGGCTACAAGAGATGTTAA
 AGCATTAAAGAATCATCATTAAAATAAGGTTTAAAAAATTAAAGTTATATACCAGGACTG
 TTCGTGTGATATTTTAATAAGAATCTGTAGTTTGGGGCTGGAGAGATGGCTCAGCGGTT
 AAGAGCATTGACTGCTTTTCCAGAGGTCCCGAGTTCAATTCCCAACGACCACATGGTGG
 CTCACGACCATCTATAATGGGATCCGATGCTCTCTTCTGGTGTATCCGAAGATAGTGAC
 AGTGTACTCATACATGAAATAAATAAATCTTTAAAAAAGAATCTGTAGTTT~~ccaqtaottog~~AA
 TAATAAGCTATGATTAACAAGAAACCACTACCCCTGATCTGAGCAGCACGGAAGCTCCA
 GAATAAAGAGAGAAGCTGAGGTTTGACACCAGGTATCAGGGGAGGAGCCTGGAGGGGT
 TTTGTTGTTTTACATCCCTTTTTGGGCAGGAAAGATGCCAATGAGCCACTGAGTGTGTA
 TAADR1 centAGGTCAGAGAACAAC~~ctgcag~~Pst IGGGCCATGTGGATTCCAGGGGTCAAAGAGGTCACC
 ATGCTTGGCAGCAAATGCCTTTACCCACTGTCTTGACACCAACTCCACCTTGGTTTTTTT
 GACAGTCTCTCCCGCACTGGAATTCACCAGCTAGGCTAGGCTGTACACCCTGGGGAC
 CCACCTCTCTGCCCCCTTGGCATTAGGATTATGAGTTGTCTCACTGTGCCTTTTTTTT
 TTTAATGTAGGTTCTAGGAATTGAACTCGGCTCTTCATGCTTACTTTGTGAGCACTTAA
 CAGACGAAGCCATCTCGCCAGCACCTAGAGTTCACTTTTCCTCCTATCTCAGTCGCCCC
 TTGTAAGAAAGTGGGATCTCTTCTAGCTCTACGCCTAAGCTCTTAATTAGAATACCAAAG
 TCTTTTTTAAACAGATCTCTGGGTAAGAGGGGAAAAGCACTCTTGCAGAGGATTCTACTT
 GAAATCCTAGTACCCAACATGCCATCTCACAACCTGCCTAGAACTCTAGCCCCAGAATAT
DR1 prox
 CAGACAGTGTCCTCTGATCTCTGTGGGTACTAGGTGTACACATTTAAAAAATAATCAGT
 AAAAAATTTAAGAAAGAAAGAAAGAAAATCCTTTGGGAGCCTGGTATAATTCTCATTCTTT
 TACATTTGCAAACCTGCGTGTGAAAAAGCCTGCCATCTCTCCTGTCATCTCTCGGTTTTATC

CAGGATCCATGCACAAAGGAGACTATAGATTTAGCCTACAGCTCACCCATAGGGAAAGC
TCCCACGAGCCTGCTAAGCGACAGCTTTTAATGAGTCATGAGGTCCTAGTCCCTCCCCA
TCTGCTACCAACCAACACTTCTTGGGCATGCTAGGTAACCCCCCCCCACCCCCACCCCCA
HNF4-RE
AACACACACACC **CAGGTCTTTGCCCTG** GGTCCAGAGTCTACGTCCTACCTACATATGGC
ACTGAGACTACCTGGAGGCTCCATGCAAGAGACGTCCCTTGTTTTCCAGGCACTGAGG
Xho I (multi cloning site)
ACCACAATCCCTAATTCCTG... **ctcgggATCTGCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCA**
+85
CCATG
Luc+

pGL3rCARprom2,2_DING~~AluI~~

~~octag~~...CAGAGTGAAGACAGAGCTTGGTTTGCTGGTACCGCTAGCTGTGCAACACTT
 -1834
 GGGCGTCTCATGTCTTCTCTAATCTTCGCTTCCCTAAGAGAGGCACAGCTGAGAACTCC
 TAGTGTTCCTGTTGATCCCTCCTGCTCATTGAGCTGAGACTGAGGCCTGGCTGTCTCT
 GCTAGGTAGTGTCACTGCTGTAACCTGACTCTAACTGATCCGCTGGTGTATCTGT
 AAAATGTTTGCGGGTGGATCGAGCCGCCACGGCT **DR1 dist**
TAACCTGTGAACTGCTGAT
 TTCCAGACAACACAGACAGACAGGAGCTGCTCCAAAGAACCTTTCTAACAGGCCCACT
 GCTCCAGTATCCTTTCTTTCCACAATCTCTGATGGGTGGTGGGCTACAAGAGATGTAA
 AGCATTTAAGAATCATCATTAAATAAGGTTTAAAAAATTAAGTTATATACCAGGACTG
 TTCGTGTGATATTTTAATAAGAATCTGTAGTTTGGGGCTGGAGAGATGGCTCAGCGGTT
 AAGAGCATTGACTGCTTTTCCAGAGGTCCCGAGTTCAATTCCCAACGACCACATGGTGG
 CTCACGACCATCTATAATGGGATCCGATGCTCTTCTGGTGTATCCGAAGATAGTGAC
 AGTGTACTCATACTGAAATAAATAAATCTTTAAAAAAGAATCTGTAGTTT **BstXI**
~~ccagttaattga~~AA
 TAATAAGCTATGATTAACAAGAAACCACTACCCCTGATCTGAGCAGCACGGAAGCTCCA
 GAATAAAGAGAGAAGCTGAGGTTTGACACCAGGTATCAGGGGAGGAGCCTGGAGGGGT
 TTTGTTGTTTTTACATCCCTTTTTGGGCAGGAAAGATGCCAATGAGCCACTGAGTGTGTA
 TAA **DR1 cent** **PstI**
AGGTCAGAGAACAAC~~ctgcag~~GGGCCATGTGGATTCCAGGGGTCAAAGAGGTCACC
 ATGCTTGGCAGCAAATGCCTTACCCACTGTCTTGACACCAACTCCACCTTGGTTTTTTT
 GACAGTCTCTCCCGCACTGGAATTCACCAGCTAGGCTAGGCTTGTACACCCTGGGGAC
 CCACCTCTCTGCCCCCTTGGCATTAGGATTATGAGTTGTCTCACTGTGCCTTTTTTTT
 TTTAATGTAGGTTCTAGGAATTGAACTCGGCTCTTCATGCTTACTTTGTGAGCACTTAA
 CAGACGAAGCCATCTCGCCAGCACCTAGAGTTCACTTTTCTCCTATCTCAGTCGCCCC
 TTGTAAGAAAGTGGGATCTCTTCTAGCTCTACGCCTAAGCTCTTAATTAGAATACCAAAG
 TCTTTTTTAAACAGATCTCTGGGTAAGAGGGGAAAAGCACTCTTGCAGAGGATTCTACTT
 GAAATCCTAGTACCCAACATGCCATCTCACAACCTGCCTAGAACTCTAGCCCCAGAATAT
 CAGACAG **DR1 prox**
TGTCCTCTGATCTCTGTGGGTAAGAGGGGAAAAGCACTCTTGCAGAGGATTCTACTT
 AAAAAATTTAAGAAAGAAAGAAAGAAAATCCTTTGGGAGCCTGGTATAATTCTCATTCTTT
 TACATTTGCAAACCTGCGTGTGAAAAAGCCTGCCATCTCTCCTGTCATCTCTCGGTTTTATC

CAGGATCCATGCACAAAGGAGACTATAGATTTAGCCTACAGCTCACCCATAGGGAAAGC
TCCCACGAGCCTGCTAAGCGACAGCTTTTAATGAGTCATGAGGTCCTAGTCCCTCCCCA
TCTGCTACCAACCAACACTTCTTGGGCATGCTAGGTAACCCCCCCCCACCCCCACCCCCA
HNF4-RE
AACACACACACC **CAGGTCTTTGCCCTG**GGTCCAGAGTCTACGTCCTACCTACATATGGC
ACTGAGACTACCTGGAGGCTCCATGCAAGAGACGTCCCTTGTTTTCCAGGCACTGAGG
ACCACAATCCCTAATTCCTGTCAGTTGTTCCCTGAGTTCACAAGGAAAGCAGGGTTATCAA
GGAGGCTTGGGGAGAGACATCCTACCCAAGATTTTGTGACCTGCATGTGGCACGCTGC
CTAAGAGAAACAGGTAGGTAATTTGTTGGAGGCCAGAGACTGAAAGCAACATTTTTGCT
TTTAGTGGAGATGGTGCTGGGGATCTGGTGTCGGGCAGTCTATGGAAGAAAAGAAGA
GAGCCCTGTGGCCCAGAGCTGACTCTTAACTCCTCCCACATTCAGGAGACC...**ctgagATCT**
(multi cloning site) **Xho I**
GCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATG +351

Luc +

pGL3rCARprom1,2 (Spaltung von pGL3rCARprom1,9 mit *Sac* I und *Bst* XI, Vektor blunt-end re-ligiert)

***Sac* I + *Bst* XI**

gaacttagttgAATAATAAGCTATGATTAACAAGAAACCACTACCCCTGATCTGAGCAGCAGG
 -1132
 GAAGCTCCAGAATAAAGAGAGAAGCTGAGGTTTGACACCAGGTATCAGGGGAGGAGCC
 TGGAGGGGTTTTGTTGTTTTTACATCCCTTTTTGGGCAGGAAAGATGCCAATGAGCCAC
 TGAGTGTGTTAA **DR1 cent** **AGGTCAGAGAACA** *Pst* I ctgcagGGGCCATGTGGATTCCAGGGGTCAAAG
 AGGTCACCATGCTTGGCAGCAAATGCCTTTACCCACTGTCTTGACACCAACTCCACCTT
 GGTTTTTTTGACAGTCTCTCCCGCACTGGAATTCACCAGCTAGGCTAGGCTGTACACC
 CTGGGGACCCACCTCTCTCTGCCCCCTTGGCATTAGGATTATGAGTTGTCTCACTGTGC
 CTTTTTTTTTTAATGTAGGTTCTAGGAATTGAACTCGGCTCTTCATGCTTACTTTGTGA
 GCACTTAACAGACGAAGCCATCTCGCCAGCACCTAGAGTTCACCTTTCCCTCCTATCTCA
 GTCGCCCCCTTGTAAGAAAGTGGGATCTCTTCTAGCTCTACGCCTAAGCTCTTAATTAGAA
 TACCAAAGTCTTTTTTAAACAGATCTCTGGGTAAGAGGGGAAAAGCACTCTTGCAGAGG
 ATTCTACTTGAAATCCTAGTACCCAACATGCCATCTCACAACCTGCCTAGAACTCTAGCCC
 CAGAATATCAGACAG **DR1 prox** **TGTCCTCTGATCT**CTGTGGGTAAGGTGTACACATTTAAAAAA
 AAATCAGTAAAAATTTAAGAAAGAAAGAAAGAAATCCTTTGGGAGCCTGGTATAATTC
 TCATTCTTTTACATTTGCAAACCTGCGTGTGAAAAAGCCTGCCATCTCTCCTGTCATCTCT
 CGGTTTATCCAGGATCCATGCACAAAGGAGACTATAGATTTAGCCTACAGCTCACCCAT
 AGGGAAAGCTCCCACGAGCCTGCTAAGCGACAGCTTTTAATGAGTCATGAGGTCCTAGT
 CCCTCCCCATCTGCTACCAACCAACACTTCTTGGGCATGCTAGGTAACCCCCCCCACCC
 CCACCCCCAACACACACACC **HNF4-RE** **CAGGTCCTTGCCCTG**GGTCCAGAGTCTACGTCCCTACCT
 ACATATGGCACTGAGACTACCTGGAGGCTCCATGCAAGAGACGTCCCTTGTTCAGG
 CACTGAGGACCACAATCCCTAATTCCTG... *Xho* I ctgcagATCTGCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGT
 +85
 TGGTAAAGCCACCATG
 Luc+

pGL3rCARprom1,0 (Spaltung von pGL3rCARprom1,9 mit *Sac* I und *Pst* I, Vektor blunt-end religiert)

***Sac* I + *Pst* I**

aaactgcagGGGCCATGTGGATTCCAGGGGTCAAAGAGGTCACCATGCTTGGCAGCAAATG
 -926
 CCTTTACCCACTGTCTTGACACCAACTCCACCTTGGTTTTTTTTGACAGTCTCTCCCGCAC
 TGAATTCACCAGCTAGGCTAGGCTTGTACACCCTGGGGACCCACCTCTCTGCCCC
 CTTGGCATTAGGATTATGAGTTGTCTCACTGTGCCTTTTTTTTTTTAATGTAGGTTCTAG
 GAATTGAACTCGGCTCTTCATGCTTACTTTGTGAGCACTTAACAGACGAAGCCATCTCG
 CCAGCACCTAGAGTTCACCTTTTCCTCCTATCTCAGTCGCCCTTGTAAGAAAGTGGGAT
 CTCTTCTAGCTCTACGCCTAAGCTCTTAATTAGAATACCAAAGTCTTTTTTAAACAGATCT
 CTGGGTAAGAGGGGAAAAGCACTCTTGACAGAGGATTCTACTTGAAATCCTAGTACCCAA
 CATGCCATCTCACAAGTGCCTAGAAGTCTAGCCCCAGAATATCAGACAGTGTCCTCTGA
DR1 prox
TCTCTGTGGGTACTAGGTGTACACATTTAAAAAAAATCAGTAAAAAATTTAAGAAAGAA
 AGAAAGAAAATCCTTTGGGAGCCTGGTATAATTCTCATTCTTTTACATTTGCAAAGTGGC
 TGTGAAAAAGCCTGCCATCTCTCCTGTCATCTCTCGGTTTATCCAGGATCCATGCACAAA
 GGAGACTATAGATTTAGCCTACAGCTCACCCATAGGGAAAGCTCCCACGAGCCTGCTAA
 GCGACAGCTTTTAATGAGTCATGAGGTCCTAGTCCCTCCCCATCTGCTACCAACCAACA
 CTTCTTGGGCATGCTAGGTAACCCCCCCCCACCCCCACCCCCAAACACACACACCCAGG
HNF4-RE
TCTTTGCCCTGGGTCCAGAGTCTACGTCCTACCTACATATGGCACTGAGACTACCTGGA
 GGCTCCATGCAAGAGACGTCCCTTGTTTTCCAGGCACTGAGGACCACAATCCCTAATTC
***Xho* I** (multi cloning site)
 CTG...ctcagATCTGCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATG
 +85 Luc +

rCARprom1,9_ΔDR1d**Mlu I**

accgatGCTAGA...CAGAGTGATGAAGACAGAGCTTGGTTTGCTGGTACCGCTAGCTGTGCAAC
-1834

ACTTGGGCGTCTCATGTCTTCTCTAATCTTCGCTTCCCTAAGAGAGGCACAGCTGAGAA
CTCCTAGTGTTCTGTTGATCCCTCCTGCTCATTTGAGCTGAGACTGAGGCCTGGCTGT
CTCTGCTAGGTAGTGTCACTGCTGTAACCTGACTCTAACTGATCCGCTGGTGTAT

Pvu I

CTGTAAAATGTTTGC GGGTGGATCGAGCCGCCACGGCTTAACcgatcgGAACCTGCTGATT
-156 -1556

TCCAGACAACACAGACAGACAGGAGCTGCTCCAAAGAACCTTTCTAAACAGGCCCACTG
CTCCAGTATCCTTTCTTTTCCACAATCTCTGATGGGTGGTGGGCTACAAGAGATGTTAAA

GCATTTAAGAATCATCATTAAATAAGGTTTAAAAAATTAAAGTTATATACCAGGACTGT

TCGTGTGATATTTTTAATAAGAATCTGTAGTTTGGGGCTGGAGAGATGGCTCAGCGGTT

AAGAGCATTGACTGCTTTTCCAGAGGTCCCGAGTTCAATTCCCAACGACCACATGGTGG

CTCACGACCATCTATAATGGGATCCGATGCTCTCTTCTGGTGTATCCGAAGATAGTGAC

Bst XI

AGTGTACTCATACATGAAATAAATAAATCTTTAAAAAAGAATCTGTAGTTTccaqtaqttgAA

TAATAAGCTATGATTAACAAGAAACCACTACCCCTGATCTGAGCAGCACGGAAGCTCCA

GAATAAAGAGAGAAGCTGAGGTTTGACACCAGGTATCAGGGGAGGAGCCTGGAGGGGT

TTTGTTGTTTTTACATCCCTTTTTGGGCAGGAAAGATGCCAATGAGCCACTGAGTGTGTA

DR1 cent**Pst I**

TAAAGGTCAGAGAACAACctgcagGGGCCATGTGGATTCCAGGGGTCAAAGAGGTCACC

ATGCTTGGCAGCAAATGCCTTACCCACTGTCTTGACACCAACTCCACCTTGGTTTTTTT

GACAGTCTCTCCCGCACTGGAATTCACCAGCTAGGCTAGGCTTGTACACCCTGGGGAC

CCACCTCTCTGCCCCCTTGGCATTAGGATTATGAGTTGTCTCACTGTGCCTTTTTTTT

TTTTAATGTAGGTTCTAGGAATTGAACTCGGCTCTTCATGCTTACTTTGTGAGCACTTAA

CAGACGAAGCCATCTCGCCAGCACCTAGAGTTCACTTTTCTCCTATCTCAGTCGCCCC

TTGTAAGAAAGTGGGATCTCTTCTAGCTCTACGCCTAAGCTCTTAATTAGAATACCAAAG

TCTTTTTTAAACAGATCTCTGGGTAAGAGGGGAAAAGCACTCTTGCAGAGGATTCTACTT

GAAATCCTAGTACCCAACATGCCATCTCACAACCTGCCTAGAACTCTAGCCCCAGAATAT

DR1 prox

CAGACAGTGTCCTCTGATCTCTGTGGTACTAGGTGTACACATTTAAAAAATAATCAGT

AAAAAATTTAAGAAAGAAAGAAAGAAAATCCTTTGGGAGCCTGGTATAATTCTCATTCTTT

TACATTTGCAAACCTGCGTGTGAAAAAGCCTGCCATCTCTCCTGTATCTCTCGGTTTTATC

CAGGATCCATGCACAAAGGAGACTATAGATTTAGCCTACAGCTCACCCATAGGGAAAGC
TCCCACGAGCCTGCTAAGCGACAGCTTTTAATGAGTCATGAGGTCCTAGTCCCTCCCCA
TCTGCTACCAACCAACACTTCTTGGGCATGCTAGGTAACCCCCCCCCACCCCCACCCCCA
HNF4-RE
AACACACACACCCAGGTCTTTGCCCTGGGTCCAGAGTCTACGTCCTACCTACATATGGC
ACTGAGACTACCTGGAGGCTCCATGCAAGAGACGTCCCTTGTTTTCCAGGCACTGAGG
Bgl II (multi cloning site)
ACCACAATCCCTAATTCCTG...CTCGgaatcGCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCA
+85
CCATG
Luc+

rCARprom1,9_ΔDR1c**Mlu I**

accggtGCTAGA...CAGAGTGATGAAGACAGAGCTTGGTTTGCTGGTACCGCTAGCTGTGCAAC

-1834

ACTTGGGCGTCTCATGTCTTCTCTAATCTTCGCTTCCCTAAGAGAGGCACAGCTGAGAA

CTCCTAGTGTTCCCTGTTGATCCCTCCTGCTCATTGAGCTGAGACTGAGGCCTGGCTGT

CTCTGCTAGGTAGTGTCACTGCTGTAACCTGACTCTAACTGATCCGCTGGTGTAT

DR1 dist

CTGTAAAATGTTTGCGGGTGGATCGAGCCGCCACGGCTTAACCTGTGAACTGAACTGC

TGATTTCCAGACAACACAGACAGACAGGAGCTGCTCCAAAGAACCTTTCTAAACAGGCC

CACTGCTCCAGTATCCTTTCTTTTCCACAATCTCTGATGGGTGGTGGGCTACAAGAGAT

GTAAAGCATTTAAGAATCATCATTAAAATAAGGTTTAAAAAATTAAGTTATATACCAG

GACTGTTTCGTGTGATATTTTAAATAAGAATCTGTAGTTTGGGGCTGGAGAGATGGCTCA

GCGGTTAAGAGCATTGACTGCTTTTCCAGAGGTCCCGAGTTCAATTCCCAACGACCACA

TGGTGGCTCACGACCATCTATAATGGGATCCGATGCTCTTCTTCTGGTGTATCCGAAGAT

Bst XI

AGTGACAGTGTACTCATACATGAAATAAATAAATCTTTAAAAAAGAATCTGTAGTTTccaqtt

agttgaAATAATAAGCTATGATTAACAAGAAACCACTACCCCTGATCTGAGCAGCACGGAA

GCTCCAGAATAAAGAGAGAAGCTGAGGTTTGACACCAGGTATCAGGGGAGGAGCCTGG

AGGGGTTTTGTTGTTTTTACATCCCTTTTTGGGCAGGAAAGATGCCAATGAGCCACTGA

Pvu I

GTGTGcgatcgTGGATTCCAGGGGTCAAAGAGGTCACCATGCTTGGCAGCAAATGCCTTT

-948 -914

ACCCACTGTCTTGACACCAACTCCACCTTGGTTTTTTTTGACAGTCTCTCCCGCACTGGAA

TTCACCAGCTAGGCTAGGCTGTACACCCTGGGGACCCACCTCTCTCTGCCCCCTTGG

CATTAGGATTATGAGTTGTCTCACTGTGCCTTTTTTTTTTTAATGTAGGTTCTAGGAATT

GAACTCGGCTCTTCATGCTTACTTTGTGAGCACTTAACAGACGAAGCCATCTCGCCAGC

ACCTAGAGTTCACTTTTCCTCCTATCTCAGTCGCCCCTTGTAAAGAAAGTGGGATCTCTTC

TAGCTCTACGCCTAAGCTCTTAATTAGAATACCAAAGTCTTTTTTAAACAGATCTCTGGGT

AAGAGGGGAAAAGCACTCTTGACAGAGGATTCTACTTGAATCCTAGTACCCAACATGCC

DR1 prox

ATCTCACAACCTGCCTAGAACTCTAGCCCCAGAATATCAGACAGTGTCCTCTGATCTCTGT

GGGTACTAGGTGTACACATTTAAAAAATAATCAGTAAAAAATTAAGAAAGAAAGAAAG

AAAATCCTTTGGGAGCCTGGTATAATTCTCATTCTTTTACATTTGCAAACCTGCGTGTGAA

AAAGCCTGCCATCTCTCCTGTCATCTCTCGGTTTATCCAGGATCCATGCACAAAGGAGA

CTATAGATTTAGCCTACAGCTCACCCATAGGGAAAGCTCCCACGAGCCTGCTAAGCGAC
AGCTTTTAATGAGTCATGAGGTCCTAGTCCCTCCCCATCTGCTACCAACCAACTTCTT
GGGCATGCTAGGTAACCCCCCCCCACCCCCACCCCCAAACACACACACC **HNF4-RE**
CAGGTCTTTG
CCCTGGGTCCAGAGTCTACGTCCTACCTACATATGGCACTGAGACTACCTGGAGGCTC
CATGCAAGAGACGTCCCTTGTTTTCCAGGCACTGAGGACCACAATCCCTAATTCCTG...
Bgl II (multi cloning site) +85
CTC**Gaatc**GCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACC**ATG**
Luc+

rCARprom1,9_ΔDR1p***Mlu* I**

acccatGCTAGA...CAGAGTGATGAAGACAGAGCTTGGTTTGCTGGTACCGCTAGCTGTGCAAC
 -1834
 ACTTGGGCGTCTCATGTCTTCTCTAATCTTCGCTTCCCTAAGAGAGGCACAGCTGAGAA
 CTCCTAGTGTTCTGTTGATCCCTCCTGCTCATTGAGCTGAGACTGAGGCCTGGCTGT
 CTCTGCTAGGTAGTGTCACTGCTGTAACCTGACTCTAACTGATCCGCTGGTGTAT
 CTGTAAAATGTTTGCGGGTGGATCGAGCCGCCACGGCTTAACCTGTGAACTGAACTGC
 DR1 dist
 TGATTTCCAGACAACACAGACAGACAGGAGCTGCTCCAAAGAACCTTTCTAAACAGGCC
 CACTGCTCCAGTATCCTTTCTTTTCCACAATCTCTGATGGGTGGTGGGCTACAAGAGAT
 GTTAAAGCATTTAAGAATCATCATTAAAATAAGGTTTAAAAAATTAAGTTATATACCAG
 GACTGTTTCGTGTGATATTTTAATAAGAATCTGTAGTTTGGGGCTGGAGAGATGGCTCA
 GCGGTTAAGAGCATTGACTGCTTTTCCAGAGGTCCCGAGTTCAATTCCAACGACCACA
 TGGTGGCTCACGACCATCTATAATGGGATCCGATGCTCTCTTCTGGTGTATCCGAAGAT
 AGTGACAGTGTACTCATAACATGAAATAAATAAATCTTTAAAAAAGAATCTGTAGTTTccaatt
 Bst XI
agttggAATAATAAGCTATGATTAACAAGAAACCACTACCCCTGATCTGAGCAGCACGGAA
 GCTCCAGAATAAAGAGAGAAGCTGAGGTTTGACACCAGGTATCAGGGGAGGAGCCTGG
 AGGGGTTTTGTTGTTTTTACATCCCTTTTTGGGCAGGAAAGATGCCAATGAGCCACTGA
 GTGTGTATAAAGGTCAGAGAACAACctgcagGGGCCATGTGGATTCCAGGGGTCAAAGA
 DR1 cent Pst I
 GGTACCATGCTTGGCAGCAAATGCCTTACCCACTGTCTTGACACCAACTCCACCTTG
 GTTTTTTTACAGTCTCTCCCGCACTGGAATTCACCAGCTAGGCTAGGCTTGACACCC
 TGGGGACCCACCTCTCTGCCCCCTTGGCATTAGGATTATGAGTTGTCTCACTGTGCC
 TTTTTTTTTTAAATGTAGGTTCTAGGAATTGAACTCGGCTCTTCATGCTTACTTTGTGAG
 CACTTAACAGACGAAGCCATCTCGCCAGCACCTAGAGTTCACTTTTCTCCTATCTCAGT
 CGCCCCTTGTAAGAAAGTGGGATCTCTTCTAGCTCTACGCCTAAGCTCTTAATTAGAATA
 CCAAAGTCTTTTTTAAACAGATCTCTGGGTAAGAGGGGAAAAGCACTCTTGCAGAGGAT
 TCTACTTGAAATCCTAGTACCCAACATGCCATCTCACAACCTGCCTAGAACTCTAGCCCCA
 Pvu I
GAATATCAGACAGcgatcgCTGTGGTACTAGGTGTACACATTTAAAAAATAATCAGTAA
 -404 -390
 AAAATTTAAGAAAGAAAGAAAGAAAATCCTTTGGGAGCCTGGTATAATTCTCATTCTTTTA
 CATTGCAAACCTGCGTGTGAAAAAGCCTGCCATCTCTCCTGTCTCTCGGTTTATCCA

GGATCCATGCACAAAGGAGACTATAGATTTAGCCTACAGCTCACCCATAGGGAAAGCTC
CCACGAGCCTGCTAAGCGACAGCTTTTAATGAGTCATGAGGTCCTAGTCCCTCCCCATC
TGCTACCAACCAACACTTCTTGGGCATGCTAGGTAACCCCCCCCACCCCCACCCCCAAA
HNF4-RE
CACACACACCCAGGTCTTTGCCCTGGGTCCAGAGTCTACGTCCTACCTACATATGGCAC
TGAGACTACCTGGAGGCTCCATGCAAGAGACGTCCCTTGTTTTCCAGGCACTGAGGAC
Bgl II (multi cloning site)
CACAATCCCTAATTCCTG...CTCGgaatcGCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACC
+85
ATG
Luc+