

**Vergleich der differentiellen Expression und Regulation
der Genfamilie der UDP-Glukuronosyltransferasen (UGT1A) im
Gastrointestinaltrakt der Ratte**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Dipl.-Biol. Bärbel Grams
geboren am 4. Februar 1968 in Hannover

Hannover 1999

Die vorliegende Arbeit wurde von PD Dr. rer. nat. W. Müller betreut und im Zentrum für Innere Medizin, Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie, der Medizinischen Hochschule Hannover, Leitung Prof. Dr. med. M.P. Manns in der Zeit von Juli 1995 bis Juni 1999 angefertigt.

Referent: PD Dr. rer. nat. W. Müller
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. B. Otto
Datum der Promotion: 21. Juli 1999

Abstract

Glucuronidation represents a major drug metabolizing reaction catalysed by a superfamily of UDP-glucuronosyltransferases (UGT). UGT-isoenzymes are located in the endoplasmatic reticulum. These proteins catalyze the conjugation of lipophilic exobiotic and endobiotic compounds, which leads to the excretion of hydrophilic glucuronides via bile and urine.

Apart from hepatic glucuronidation, high rates of gastrointestinal glucuronidation have been observed. The aim of this work was to characterize the expression of family 1 UGT's (UGT1A) in liver, kidney and all parts of the rat gastrointestinal tract. The rat UDP-glucuronosyltransferases (UGT1A) locus encodes up to 9 unique transferases that are transcribed through selective exon sharing. UGT1A4 and UGT1A9 are pseudogenes. Little is known about the expression and inducibility of specific UGT's in the rat gastrointestinal tract.

RT-PCR experiments were performed with primers specific for all known rat UGT1A mRNAs-isoenzymes. The experiments show a complete expression pattern of rat UGT1A genes in different segments of the rat intestine. UGT1A1, UGT1A6 and UGT1A7 were expressed in liver, kidney and in the whole gastrointestinal tract. UGT1A5 mRNA transcripts were exclusively detected in the liver, but not in kidney or in other parts of gastrointestinal tissue. In contrast, UGT1A2 and UGT1A3 were not expressed in liver or kidney, but were found in the intestine. These results demonstrate that „liver-specific“ as well as „intestinal-specific“ UGT-isoenzymes exist. For the first time, the RT-PCR experiments also demonstrate the expression of UGT1A9-mRNA.

Quantitative evaluation of RNA-levels by Northern blot revealed expression in gradients with highest UGT1A-mRNA levels in duodenum and decreasing levels in small and large intestine. UGT1A proteins are individually regulated in a tissue specific manner. Expression levels are highest in duodenum and jejunum, which are characterized by a considerable surface area and are therefore intensively exposed to food-borne toxins and potentially deleterious substances. The most expression data could be confirmed on the protein-level by Western blots.

Induction experiments show that three of seven intact UDP-glucuronosyltransferases are inducible by methylcholanthrene (MC). After induction with methylcholanthrene the rats displayed a strong induction of hepatic UGT1A6 and UGT1A7 mRNAs. In gastric tissue, and in intestine the induction was, lower respectively. Effects of MC on UGT1A1 expression revealed down-regulation in liver and highly variable effects in duodenum and stomach. The induction experiments show a complex regulation of the UGT1A gene complex by methylcholanthrene. However, induction by MC may be more complex and may involve mechanisms other than the Ah-receptor pathway alone for the regulation of transcription.

This study demonstrates tissue specific expression and tissue specific induction pattern in rat liver, kidney and in the gastrointestinal tract, which may represent the physiological basis of tissue specific glucuronidation in rats.

Key words:

UDP-glucuronosyltransferases; tissue specific regulation; tissue specific expression; intestine.

Zusammenfassung

Die UDP-Glukuronosyltransferasen sind eine Superfamilie mikrosomaler Proteine, die als Phase-II Enzyme der Entgiftung eine entscheidende Rolle im Endobiotika- und Xenobiotikametabolismus spielen. Durch Konjugation einer Glukuronsäure an hydrophobe Substrate eliminieren die UGT's ein breites Spektrum an hydrophoben Toxinen, Karzinogenen und Arzneimitteln. Durch diese Glukuronidierung wird eine biliäre- oder renale Ausscheidung der nun hydrophileren Substanzen ermöglicht.

Viele Schadstoffe werden über die Nahrung aufgenommen und treten zuerst mit der Darmmukosa in Kontakt. Somit muß auch der Intestinaltrakt einen entscheidenden Beitrag zur Entgiftung des Organismus leisten. Da über die UGT1A-Proteine im Intestinaltrakt bisher wenig bekannt ist, stellt diese Arbeit eine erste Grundlage zur Expression und Regulation der UGT1A-Proteine in den einzelnen Darmabschnitten dar. Bisher sind in der Ratte neun verschiedene UGT1A-Gene identifiziert worden, wobei es sich bei UGT1A4 und UGT1A9 um Pseudogene handelt.

In den vorliegenden Untersuchungen sollte die Expression der UGT1A-Gene in der Leber, der Niere und in allen Teilen des Gastrointestinaltrakts der Ratte genauer charakterisiert werden. Es stellte sich heraus, daß die Ratte im Gastrointestinaltrakt über ein komplexes Muster an UGT's der Familie I verfügt, die zum Teil höher exprimiert sind als in der Leber. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch dazu, daß UGT's vor allem in der Leber, dem dominanten Entgiftungsorgan, exprimiert sind. Mit Hilfe der RT-PCR konnten fünf der sieben bisher bekannten intakten UGT1A-Transkripte im Darm der Ratte nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um: UGT1A1, UGT1A2, UGT1A3, UGT1A6 und UGT1A7. Die UGT's zeigen eine gewebsspezifische Expression, die von proximal nach distal „Gradienten“ bilden. Die höchste Expression der UGT1A-Isoenzyme wurde im Duodenum gefunden, wo physiologisch eine besonders starke Belastung an Schadstoffen durch die große Oberfläche dieses Organs stattfindet. In der Leber konnte bisher UGT1A1 und UGT1A6 nachgewiesen werden. Die Untersuchungen dieser Arbeit haben jedoch ergeben, daß zusätzlich die mRNA von UGT1A5, UGT1A7 und UGT1A9 exprimiert wird. Es konnten „Darm“- sowie „Leber-spezifische“ UGT1A-Vertreter identifiziert werden. Die gefundenen Expressionsdaten wurden größtenteils auf Proteinebene bestätigt. Das in der Ratte gefundene organspezifische Expressionsmuster unterscheidet sich von denen des Menschen.

Inwieweit die Regulation des UGT1A-Genkomplexes der Ratte in der Leber und im Gastrointestinaltrakt auf „Veränderungen von Umweltfaktoren“ reagiert, wurde anhand von Induktionsversuchen untersucht. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß drei der sieben intakten Glukuronosyltransferasen der Familie 1 durch Methylcholanthren (MC) induzierbar waren. Die Induktion mit Dexamethason, Phenobarbital und Clofibrat war deutlich schwächer ausgeprägt. UGT1A1, UGT1A6 und UGT1A7 weisen gewebsspezifisch stark voneinander abweichende Induktionsmuster auf. So konnte in der Leber für das UGT1A6 und UGT1A7 eine starke Induktion nach MC-Behandlung gezeigt werden, jedoch wurde im selben Organ gleichzeitig die mRNA des UGT1A1 durch MC reduziert.

Insgesamt zeigen die Induktionsexperimente eine komplexe Regulation des UGT1A-Genkomplexes durch Methylcholanthren, die nicht nur durch einen Induktionsmechanismus erklärt werden kann. Die Auswirkungen auf Niere und Magen, waren deutlich geringer ausgeprägt als auf die Leber. Auch die Induktion im Gastrointestinaltrakt war erheblich schwächer als in der Leber.

Die Ergebnisse zeigen eine konstitutive Expression des UGT1A-Genkomplexes, der im Gegensatz zu den Phase-I Enzymen der Entgiftung (P450 Cytochrome) eine geringere Induzierbarkeit aufweist.

Schlüsselwörter:

UDP-Glukuronosyltransferasen; gewebsspezifische Expression; Gastrointestinaltrakt

Inhaltsverzeichnis

	Seite:
1. Einleitung	1
1.1. Funktion und genetische Organisation der UDP-Glukuronosyltransferasen	1
1.2. UDP-Glukuronosyltransferasen und ihre Rolle in der Karzinogenese	7
1.3. Bedeutung extrahepatischer UDP-Glukuronosyltransferasen	8
1.4. Ziel der Arbeit	10
2. Material und Methoden	11
2.1. Material	
2.1.1. Versuchstiere, Eukaryontische Zellen, Bakterienstämme	11
2.1.1.1. Versuchstiere	11
2.1.1.2. Eukaryontische Zellen	11
2.1.1.3. Bakterienstämme	11
2.1.2. DNA	12
2.1.2.1. Plasmide	12
2.1.2.2. Oligonukleotide	12
2.1.3. Chemikalien und Radiochemikalien	12
2.1.3.1. Chemikalien	12
2.1.3.2. Radiochemikalien	14
2.1.4. Molekulargewichtsmarker	15
2.1.4.1. DNA-Marker	15
2.1.4.2. Proteinmarker	15
2.1.5. Enzyme	15
2.1.6. Antikörper	16
2.1.7. Kommerzielle Kits	16
2.1.8. Sonstige Materialien	16

2.2. Methoden	17
2.2.1. Klonierungstechniken	17
2.2.1.1. Vermehrung von transformierten Bakterien	17
2.2.1.2. Anlegen eines Glycerolstocks	17
2.2.1.3. Plasmidisolierung	18
2.2.1.3.1. Maxipräparation	18
2.2.1.3.2. Minipräparation	19
2.2.1.4. Restriktionsverdau der Plasmide	20
2.2.1.5. Isolation und Reinigung der DNA-Fragmente	20
2.2.1.6. Bestimmung der DNA-Fragmente	21
2.2.1.7. Ligation von PCR-Produkten in den pCR 2.1.-Vector und Kolonieselection	21
2.2.1.8. Transformation	22
2.2.1.9. Sequenzierung	22
2.2.2. Quantitativer Nachweis der Proteine durch Antikörper	25
2.2.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	25
2.2.2.2. Western Blot	26
2.2.2.3. Proteinfärbung in SDS-Gelen	28
2.2.2.3.1. Gelfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blue G250	28
2.2.2.3.2. Sypro-Orange Färbung	28
2.2.2.4. Mikrosomenpräparation	29
2.2.2.5. Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradfordassay)	29
2.2.2.6. Affinitätsaufreinigung mikrosomaler Proteine	29
2.2.2.7. Immunfluoreszenz	30
2.2.3. Gewinnung der RNA aus Gewebe	31
2.2.3.1. Induktionsversuche	31
2.2.3.2. Extraktion von RNA	31
2.2.4. PCR (Polymerasekettenreaktion)	32
2.2.4.1. Auswahl der Primer für die PCR zur Unterscheidung der UGT1A-Isoenzyme	33

2.2.4.2. Herstellung genomischer DNA	34
2.2.4.3. DNase-Verdau	35
2.2.4.4. Reverse-Transkriptase (RT)-Reaktion	36
2.2.4.5. PCR-Reaktion zur Erkennung der UGT1A-Isoenzyme	36
2.2.5. Northern Blot	38
2.2.5.1. RNA-Gelelektrophorese	38
2.2.5.2. SSC-Kapillar Blot	39
2.2.5.3. Markierung von DNA-Sonden mit [α - ³² P] dCTP	39
2.2.5.4. Hybridisierung eines Northern Blots	40
2.2.5.5. Entfernung („strippen“) der radioaktiven Probe von der Membran	40
2.2.5.6. Auswahl der Sonden zur Erkennung der UGT1A-Proteine	41
2.2.5.7. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase)	42
2.2.6. Herstellung monospezifischer Antikörper	42
2.2.6.1. Reinigung des C-Terminus aus „inclusion bodies“	42
2.2.6.1.1. Reinigung der Proteine durch präparative Gelelektrophorese	43
2.2.6.1.2. Ultrafiltration mit Amicon-Zentrifugenröhrchen	44
2.2.6.2. Herstellung von Peptidantikörpern	44
2.2.7. Immunisierung von Kaninchen	44
2.2.8. Aktivitätstest	45
3. Ergebnisse	46
3.1. Charakterisierung des Expressionsmusters der UGT1A-Isoformen mittels RT-PCR	46
3.2. Quantifizierung des Expressionsmusters der UGT1A-Isoenzyme	50
3.2.1. Expression der UGT1A-Isoenzyme	52
3.2.2. Expression des UGT1A1	53
3.2.3. Expression des UGT1A2	54
3.2.4. Expression des UGT1A3	55
3.2.5. Expression des UGT1A6	56

3.2.6. Expression des UGT1A7	57
3.2.7. Expression des UGT1A5, UGT1A8 und UGT1A9	58
3.3. Induktionsversuche	58
3.3.1. Induktion mit Methylcholanthren (MC)	59
3.3.1.1. UGT1A7 nach Methylcholanthren -Behandlung	59
3.3.1.2. UGT1A6 nach Methylcholanthren -Behandlung	60
3.3.1.3. UGT1A1 nach Methylcholanthren -Behandlung	62
3.3.1.4. UGT1A9 nach Methylcholanthren -Behandlung	64
3.4. Induzierbarkeit von Dexamethason, Phenobarbital und Clofibrat	65
3.4.1. Induzierbarkeit des UGT1A6	65
3.4.2. Induzierbarkeit des UGT1A1	66
3.4.3. Induzierbarkeit des UGT1A7	66
3.5. Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern	67
3.5.1. Herstellung eines Antikörpers gegen den C-Terminus des UGT1A1	67
3.5.2. Herstellung monospezifischer Peptidantikörper	71
3.6. Untersuchung der Glukuronosyltransferasen (UGT1A)-Aktivität	73
4. Diskussion	76
4.1. Expression der UGT1A-Isoenzyme im Gastrointestinaltrakt der Leber und Niere	77
4.2. Induktionsverhalten der Glukuronosyltransferasen der Familie I	85
4.3. Expression und Induktion des UGT1A1 und des UGT1A9	90
4.4. Glukuronidierungsaktivität der UGT1A-Proteine	92
5. Literaturverzeichnis	94

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ah-R	Arylhydrocarbon-Rezeptor
AK	Antikörper
AP-1	activator protein-1
APS	Ammonium Persulfat
ARNT	Ah-receptor nuclear translocator
AS	Aminosäure
β-Gal	β-Galactosidase
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
BNF	β-Naphthoflavone
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
°C	Celsius
ca.	circa
COOH	Carboxyl-
CF	Clofibrat
Ci	Curie
Cpm	counts per minute
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ddNTP	Di-Desoxynukleotide
Dex	Dexamethason
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreithol
ECL	Enhanced Chemilumineszens
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N,N'-tetraacetat
ER	endoplasmatischen Reticulums

Abkürzungsverzeichnis

et al.	und andere
etc.	et cetera
Fa.	Firma
Fam.	Familie
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GITC	Guanidinium-Isothiocyanat
h	Stunden
IF	Immunfluoreszenz
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
kb	Kilopasenpaare (kilo-base-pairs)
kd	Kilodalton
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
konz.	Konzentriert(e)
l	Liter
LB	Luria Broth
Lsg.	Lösung
L-T3	3,3',5 triiodo-L-thyronin
m	milli
μ	mikro
M	Mol
MC	Methylcholanthren
min.	Minute(n)
ml	Mililiter
mM	Milimol
MOPS	3-[N-Morpholino]-2-hydroxypropansulfonic acid
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Molecular-weight-marker (Molekulargewicht)
n	Nano
NBT	Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid
NH ₂	Amino-
OD	optische Dichte
OH	Hydroxyl-

Abkürzungsverzeichnis

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAH	polyzyklischer Hydrocarbone
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PB	Phenobarbital
PBS	Phosphatgepufferte Saline
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung por Minute (rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	Sulfhydril-
spez.	spezifisch
SSC	Saline-sodium-citrate-buffer
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borate-EDTA-buffer
TCDD	2,3,7,8,-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Internationale Einheit (engl: Unit)
u.a.	und andere
UDP	Uridindipohosphat-
UGT	Uridindiphosphat-Glukuronosyltransferase
UV	Ultraviolett
vol.	volume
v/v	volume/volume
w/v	Gewicht pro Volumen bei Prozentangabe (weight/volume)
XRE	Xenobiotic Responsiv Elements
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1

1.1. Funktion und genetische Organisation der UDP-Glukuronosyltransferasen

Unser Körper ist einem steten Strom von Schadstoffen jeglicher Art aus Luft, Nahrung und Medikamenten ausgesetzt. Um diese toxischen Substrate schnell und effizient zu entgiften, ist der Körper mit Geweben ausgestattet, die diese Schadstoffe in weniger giftige, wasserlösliche Substanzen umwandeln und so ihre Ausscheidung vorbereiten.

Die Superfamilie der Uridindiphosphat Glukuronosyltransferasen (UGT`s) bilden eines der bedeutsamsten zellulären Detoxifikations- und Metabolisierungssysteme im Organismus (Dutton et al. 1980). Die in der inneren Membran des endoplasmatischen Reticulums (ER) lokalisierten UGT-Proteine katalysieren die Konjugation von hydrophoben Substraten mit Glukuronsäure unter Verwendung von Hydroxyl- (-OH), Amino- (-NH₂), Sulfhydryl- (-SH) oder Carboxyl- (-COOH) gruppen (Bock, 1994). Aufgrund der Genstruktur der UGT`s wird angenommen, daß sich die aktive Domäne der UGT`s in der luminalen Membran des endoplasmatischen Reticulums befindet (Iyanagi et al. 1986 und Jansen et al. 1992). Anhand der Membrantopologie muß davon ausgegangen werden, daß die UDP-Glukuronsäure im Cytoplasma synthetisiert und durch die Membran zur aktiven Seite transportiert wird. Hauser et al. 1988, Vanstapel und Blanckaert, 1988 und Milla et al. 1992 konnten eindeutige Beweise für einen Carrier der UDP-Glukuronsäure aufzeigen.

Die gebildeten Glukuronide sind polarer, besser wasserlöslich, biologisch inaktiver und können somit leichter über die Niere oder Galle eliminiert werden. UGT-Proteine entfalten ihre katalytische Aktivität im Kontext komplementärer Entgiftungsmechanismen (Tukey et al. 1990). Der zelluläre Entgiftungsmetabolismus kann in zwei Phasen unterteilt werden, wobei die UGT`s in der Phase-II der Entgiftung eine wesentliche Rolle spielen (Bock et al. 1987) (**s. Abb. 1**). In der Phase-I führt die oxidative Aktivierung der Substrate zu reaktiven zytotoxischen Metaboliten, was überwiegend durch die Monoxigenase-Aktivität der Cytochrom P450 Proteine katalysiert wird (Guengerich, 1988 und Parke et al. 1991). Die Phase-II dagegen, nutzt reaktive Oxidationsprodukte als Substrate für Konjugationsreaktionen, die dann schließlich zu ihrer Inaktivierung und wasserlöslichen Eliminierung führen (Bock et al. 1987).

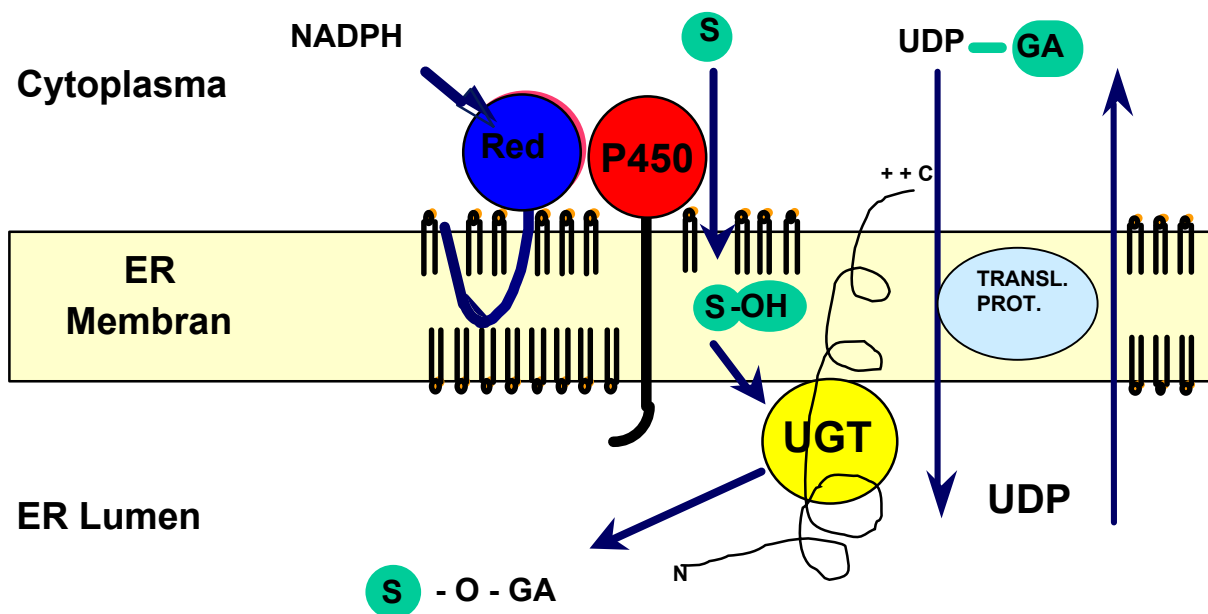


Abbildung 1: Zusammenspiel von oxidativer Aktivierung (Phase-I) und Konjugation (Phase-II) am Beispiel der Cytochrome P450 und UDP-Glukuronosyltransferasen.

P450 : Chytochrome P450, **Red**: NADPH-P450-Reduktase; **S**: Substrat, **UDP-GA**: Glukuronsäure, **UGT**: UDP-Glukuronosyltransferasen, **Transl. Prot.**: Translokationsprotein, **ER**: endoplasmatisches Reticulum

UGT-Proteine sind nicht nur für die Umsetzung endobiotischer Substrate verantwortlich, sondern sie metabolisieren auch ein weites Spektrum exobiotischer und pharmakologischer Moleküle (Tephly et al. 1990). Dazu zählen unter anderem Karzinogene wie zum Beispiel primäre Amine, Benzpyrene und andere polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK),

sowie Steroidhormone, nicht steroidale Antiphlogistika und Psychopharmaka (Ebner et al. 1993, Green et al. 1996, Kim et al. 1997 und Mojarrabi et al. 1996).

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß viele Schadstoffe und Arzneimittel wie Phenole, Amine oder carboxylhaltige Substanzen unter Umgehung der Phase-I direkt konjugiert werden können. In Anbetracht des breiten Spektrums von Zielsubstanzen, die durch Glukuronidierung aus dem Organismus eliminiert werden, war zu erwarten, daß die Superfamilie der Glukuronosyltransferasen einer komplexen Regulation unterliegen muß.

Trotz ihrer immensen Bedeutung für die Entgiftung ist der Wissensstand der Glukuronosyltransferasen bis heute immer noch lückenhaft. Ein wesentlicher Grund hierfür lag an technischen Schwierigkeiten, die die Entwicklung dieses Forschungsgebiets insgesamt verzögert haben. Bei den Glukuronosyltransferasen handelt es sich um instabile Membranproteine, die nur in Gegenwart von Phospholipiden aktiv sind (Dutton et al. 1980 und Tephly et al. 1990). Dabei scheint außerdem entscheidend zu sein, um welche Art von Phospholipid es sich handelt. So konnten Zakim et al. 1988 zeigen, daß negativ geladene Phospholipide inhibitorische Wirkung ausüben, wohingegen sich neutrale oder positiv geladene Phospholipide als Aktivatoren auszeichnen.

Problematisch war bereits die Reinigung von einzelnen Glukuronosyltransferasen, da die Präparate häufig mit Verunreinigungen durch eng verwandte UGT's behaftet waren und so das gemessene Substratspektrum der vermeintlich reinen Enzympräparation verfälschen konnten (Tephly et al. 1990). Aufgrund des 100 %-igen Homologiegrades des C-terminalen Endes war es außerdem nicht möglich monospezifische Antiseren herzustellen (Burchell et al. 1991 und Ritter et al. 1992).

Die Anwendung neuer gentechnischer Methoden in den letzten Jahren, führte schließlich zum Aufschwung dieses Forschungszweiges. Das aufwendige Reinigen der Glukuronosyltransferasen wurde durch die Expression in Zelllinien wie COS1 und V79 ersetzt, die ein Messen der Substratspektren in ungereinigten Zellextrakten erlauben (Lamp et al. 1994 und Ebner et al. 1993). Weiterhin ist es gelungen, durch heterologe Expression divergenter UGT-Sequenzen erste monospezifische Sonden für Western Blot-Analysen und Immunhistochemie bereitzustellen (Ouzzine et al. 1994). Inzwischen sind etwa 20 UGT-Isoformen bei Nagetieren und beim Menschen kloniert (Emi et al. 1995).

Auf Sequenzvergleich basierend werden bei der Ratte und beim Menschen die Glukuronosyltransferasen in Familie 1 (UGT1A) und Familie 2 (UGT2) unterschieden (Burchell et al. 1991 und Mackenzie et al. 1997). Der UGT1A-Genort der Ratte umfaßt etwa 120 kb und bildet einen Genkomplex, wie es bereits für das humane Genom beschrieben wurde (Ritter et al. 1992, Bosma et al. 1992 und Emi et al. 1995). Die Besonderheit in der Bildung individueller UGT1A-Transkripte besteht darin, daß der UGT1A-Genort durch eine Serie verschiedener Exon 1-Kassetten am 5'-Ende charakterisiert ist und daß diese durch selektive Transkription mit 4 konstanten Exons (Exon 2-5) am 3'-Ende kombiniert werden können (Emi et al. 1995). Die Anzahl der Exons 1 ist speziesspezifisch. Auf diese Weise können potentiell bei der Ratte 9 und beim Menschen 12 divergente UGT1A-Proteine kodiert werden. In der Ratte wurden UGT1A4 und UGT1A9 als Pseudogene identifiziert, wobei in beiden Sequenzen jeweils ein Stop-Codon gefunden werden konnte (Iyanagi, 1991). Beim Menschen wurden drei Pseudogene identifiziert. Es handelt sich dabei um UGT1A2, UGT1A11 und UGT1A12.

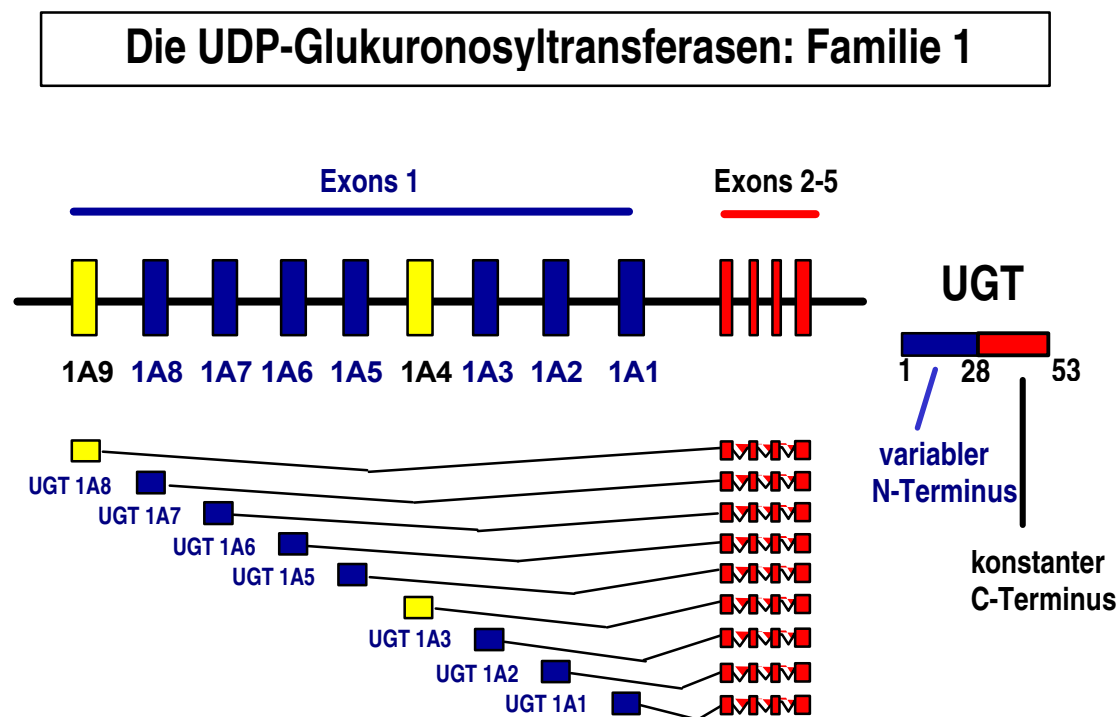


Abbildung 2: Die Organisation des UGT1A-Genkomplexes ermöglicht eine exakte Expression der einzelnen UGT1A-Isoformen. Die individuellen UGT1A-Transkripte entstehen durch differentielles Splicing divergenter Exons 1 an gemeinsame Exons 2-5.

Die Expression der UGT1A-Proteine wird über die Transkription der divergenten Exon 1 reguliert, die voneinander unabhängige Promotorbereiche besitzen, was zu Unterschieden in der Gewebsspezifität, der Expressionshöhe und Induzierbarkeit der einzelnen Glukuronosyltransferasen führt. Die Induzierbarkeit einzelner Glukuronosyltransferasen der Familie I durch Methylcholanthren, Dexamethason, Phenobarbital oder Clofibrat ist teilweise schon von Haenninen et al. 1968 auf Aktivitätsebene und von Emi et al. 1995 auf mRNA-Ebene beschrieben worden.

Die UGT2B Genprodukte sind dagegen auf separaten Genen kodiert (Burchell et al. 1991 und Burchell et al. 1994). UGT1A-Proteine zeigen weniger als 50 % Sequenzhomologie zu UGT2B-Proteinen. So wurden UGT's der Unterfamilie 2A im Nasenepithel gefunden, wo sie für eine rasche Beseitigung von Geruchsstoffen sorgen und somit für die zeitliche Auflösung der Geruchswahrnehmung unentbehrlich sind (Lazard et al. 1991). Die Enzyme der Unterfamilie 2B sind dagegen in vielen Geweben vorhanden und setzen hauptsächlich Steroide, Gallensäure und größere Substrate um (Burchell et al. 1994).

Trotz der enormen Fortschritte der letzten Jahre ist es bisher nur gelungen einen Bruchteil der vorhandenen Glukuronosyltransferasen zu klonieren. Deshalb sind für die Umsetzung zahlreicher Medikamente und Giftstoffe die verantwortlichen Isoenzyme noch nicht identifiziert worden. In verschiedenen Patientenkollektiven haben Messungen der Aktivität der Glukuronosyltransferasen ergeben, daß große individuelle Unterschiede bestehen (Matern et al. 1984 und Tephly et al. 1990). Diese Arbeiten deuten auf die Existenz von Polymorphismen humaner UGT1A-Proteine hin. Untersucht wurden bisher Polymorphismen allerdings nur beim humanen UGT1A1, der Bilirubintransferase, wobei Defekte dieser UGT1A-Isoform in der enzymatischen Aktivität mit verschiedenen Krankheitsbildern assoziiert sind. Ein mutationsbedingter Totalausfall der Bilirubintransferase führt zum Verlust des einzig effektiven Eliminationsweges für das Hämabbauprodukt Bilirubin und damit zu den fatalen Folgen des Kernerkerus. Diese Stoffwechselerkrankung wird als Crigler-Najjar-Syndrom Typ-I bezeichnet (Chowdhury et al. 1994, Ritter et al. 1992, Ritter et al. 1993, Moghrabi et al. 1993 und Seppen et al. 1994). Durch die extrem hohe Bilirubinkonzentration im Blut und die damit verbundene Toxizität haben diese Patienten leider nur eine sehr geringe Lebenserwartung. Anders dagegen verhält es sich beim Crigler-Najjar-Syndrom Typ-II, wo die Bilirubintransferase noch eine geringe Restaktivität beibehält. Bei dieser Erkrankung führt der therapeutische Einsatz von Phenobarbital zu einer erhöhten Aktivität der Bilirubintransferase und somit zu einer Re-

duktion des Bilirubinspiegels im Blut (Black et al. 1970 und Burchell et al. 1994). Das Gilbert-Syndrom, auch Morbus-Meulengracht genannt, zeichnet sich ebenfalls durch eine unkonjugierte Hyperbilirubinämie aus, wobei die Bilirubintransferase in ihrer Aktivität aber nur wenig reduziert ist. Im Gegensatz zum Crigler-Najjar-Syndrom wird das Gilbert-Syndrom dominant vererbt. Aono et al. 1995 vermuten, daß die Dominanz auf Dimerenbildung von Glukuronosyltransferasen zurückzuführen ist, wodurch wenig aktive UGT-Moleküle auch die Aktivität intakter Schwestermoleküle beeinträchtigen. Das Gilbert-Syndrom ist bei 5-7 % der Bevölkerung nachweisbar, wobei bevorzugt Männer betroffen sind. Es handelt sich hierbei um eine harmlose Stoffwechselerkrankung, die zwar lebenslang beibehalten wird, jedoch nicht behandlungsbedürftig ist und bei der die Patienten eine normale Lebenserwartung besitzen.

Es ist anzunehmen, daß Polymorphismen nicht nur auf das lebensnotwendige UGT1A1 beschränkt sind, sondern aufgrund des geringen Selektionsdrucks bei anderen UGT's noch häufiger zu finden sind. Wahrscheinlich werden wie beim Gilbert-Syndrom die mit diesen UGT's verknüpften Mängel im UGT-Muster dominant vererbt. Das Fehlen einzelner Glukuronosyltransferasen könnte eine toxische Wirkung bestimmter Medikamente und Schadstoffe in den betroffenen Patienten verstärken. Erste Hinweise für solche Zusammenhänge liegen bereits im Tiermodell vor. So zeichnet sich die UGT1A-defiziente Gunn Ratte durch eine Hyperbilirubinämie aus und wird daher als Tiermodell und für Gentherapiestudien eingesetzt (Iyanagi et al. 1989, ElAwady et al. 1990, Sato et al. 1990 und Iyanagi 1991). Gunn Ratten zeigen eine reduzierte Glukuronidierung von Benzpyrenmetaboliten bei erhöhter oxidativer Aktivierung und resultierender Zytotoxizität, Protein- sowie DNA-Bindung (Hu et al. 1992). So konnte eine erhöhte Sterblichkeit der Föten bei der Gabe des Teratogen/Carcinogen Benz(o)pyren während der Schwangerschaft verzeichnet werden (Hu et al. 1992).

Außerdem sind bereits für die Entgiftungsenzyme der Phase-I, die P450 Cytochrome, zahlreiche Polymorphismen beschrieben worden. So tritt ein vollständiger Ausfall des P450 2D6 mit einer Häufigkeit von 10% in der Bevölkerung auf (Gough et al. 1990).

1.2. UDP-Glukuronosyltransferasen und ihre Rolle in der Karzinogenese

Die UDP-Glukuronosyltransferasen spielen auch eine wichtige Rolle in der chemischen Karzinogenese durch die Eliminierung nukleophiler karzinogener Metabolite wie Phenole, Quinole oder polyzyklische aromatische Hydrocarbone. Sie verhindern eine weitere Oxidation zu Elektrophilen, so daß eine Reaktion mit DNA, RNA oder Protein gar nicht erst stattfinden kann. Die Glukuronidierung durch UGT's und die damit verbundene renale- oder biliäre Exkretion stellt einen stabilen Mechanismus dar, um potentielle Karzinogene zu inaktivieren (Bock, 1991).

Eine große Anzahl exogener und endogener lipophiler Substrate werden durch Phase-I Enzyme in nukleophile- und elektrophile Metabolite umgewandelt. Es konnte gezeigt werden, daß Interaktionen dieser Metabolite mit zellulären Makromolekülen in der Lage sind, Zytotoxizität zu initiieren und somit einen entscheidenden Beitrag zur Entstehung eines karzinogenen Prozesses zu leisten (Miller et al. 1981). An dieser Stelle wird deutlich, welche Bedeutung den Phase-II Enzymen zukommt. So ist das Gleichgewicht zwischen Phase-I und Phase-II Enzymen dafür verantwortlich, ob Detoxifikation oder eine Akkumulierung toxischer Metabolite in der Zelle stattfindet.

In diesem Zusammenhang ist es jedoch wichtig zu erwähnen, daß nicht alle Konjugate die gleiche Reaktivität aufweisen. Schwefelsäure- oder Essigsäureester sind erheblich reaktiver als vergleichbare Komponenten und stellen somit potentielle Karzinogene dar (Miller et al. 1986). So konnte für den Schwefelsäureester des N-Hydroxy-2-Aminofluoren gezeigt werden, daß er an die DNA bindet und in der Lage ist, Protoonkogene wie *c-Ha-ras* zu aktivieren (Miller et al. 1986 und Wieseman et al. 1986).

Immer mehr Hinweise sprechen für eine Unterscheidung der letzten zwei Stadien in der Karzinogenese. Findet eine Aktivierung von Protoonkogenen statt, wird dies als Initiation bezeichnet, wohingegen ein zytotoxischer Zellschaden, der das regenerative Wachstum von toxin-resistenten Zellen stimuliert, als Tumor Förderung angesehen wird.

Bei der unvollständigen Verbrennung organischer Materie werden polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe gebildet, die über die Atemluft, Tabakrauch und zubereitete Nahrung in den Organismus gelangen. Von besonderer biologischer Bedeutung als Karzinogene und Mu-

tagene sind Benzpyren (Osborne et al. 1987) und heterozyklische aromatische Amine (Adams et al. 1983 und Hoffmann et al. 1991). Es konnte gezeigt werden, daß bei der normalen Zubereitung von Fleisch PAK gebildet werden (Sugimura, 1985 und Felton et al. 1991), die auch in Zigarettenrauch (Manabe et al. 1991), Bier und Wein (Manabe et al. 1993) vorkommen und als starke Mutagene fungieren (Tanata et al. 1985 und Ohgaki et al. 1991). In Tiermodellen, Zellkulturen und am Menschen konnte gezeigt werden, daß zelluläre PAK-Exposition zur starken Induktion von Cytochrom P450 1A1- und weniger P450 1A2-Expression führt, was eine erhöhte Aktivierung von Karzinogenen zur Folge hat (Guengerich et al. 1988). Die transkriptionelle Regulation dieses Effektes wird hauptsächlich durch das *xenobiotic responsive element* (XRE) sowie den *aromatic hydrocarbon receptor* (Ah-R) vermittelt (Whitlock et al. 1996). Proteine des Phase-II Metabolismus, insbesondere UGT's, eliminieren in der Folge aktivierte Karzinogene durch Konjugationsreaktionen. In Ratten und Mäusen ist die UGT-Regulation ebenfalls unter XRE-Kontrolle und somit ihre Induktion parallel zur Phase-I Induktion (Lamp et al. 1994 und Emi et al. 1996).

Zusammengenommen ergibt sich ein akutes karzinogenetisches Risiko potentiell immer dann, wenn der Phase-I Metabolismus in der Zelle überwiegt und nicht durch Phase-II Protektion eliminiert wird (Bock, 1991).

Es wird angenommen, daß in bis zu 70 % aller malignen Tumoren chemische Karzinogenese und Mutagenese, vor allem PAK, kausal beteiligt sind (Kadlubar et al. 1991). Auf diesem Hintergrund erfüllen zelluläre Detoxifikations- und Metabolisierungsproteine eine Schlüsselfunktion der chemischen Karzinogenese.

1.3. Bedeutung extrahepatischer UDP-Glukuronosyltransferasen

Bisher hat sich die Erforschung und Charakterisierung der Glukuronosyltransferasen fast ausschließlich auf die Leber konzentriert. Bemerkenswert ist jedoch die Erkenntnis, daß die UGT1A-Expression nicht nur in der Leber, dem größten Metabolisierungsorgan, nachweisbar ist, sondern auch in extrahepatischen epithelialen Geweben wie Magen und Intestinaltrakt (Aitio, 1974; Aitio et al. 1980 und Dutton, 1980) einer präzisen, gewebstypischen, differentiellen Regulation unterliegt. Diese Gewebe sind als anatomische Oberflächenepithelien in entscheidendem Maße auf zelluläre Entgiftungs- und Metabolisierungsvorgänge angewiesen. Speziell die durch Verbrennungsgase, Tabakrauch und gebratene Nahrung aufgenommenen

polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe üben zytotoxische und genotoxische Effekte aus, für die bereits auch eine kausale Beziehung zum Magen- und anderen Karzinomen festgestellt werden konnte (Thorgeirsson et al. 1994 und LaVeccia et al. 1995). Welche zellulären Proteine eine Zytoprotektion dieser Gewebe vermitteln, ist im Detail bisher noch nicht untersucht worden.

Über die Verteilung und Zusammensetzung der Glukuronosyltransferasen in den verschiedenen Epithelien des Gastrointestinaltrakts ist bisher nur wenig bekannt, obwohl diese die erste chemische Barriere bilden. Es ist bekannt, daß die Metabolisierungsaktivität im Darm erheblich geringer ausfällt, als in der Leber. Die enzymatische Aktivität der Glukuronosyltransferasen auf Protein bezogen, liegt im Duodenum für die meisten Substrate bei etwa 30% (Haenninen et al. 1968 und Chowdhury et al. 1985). Für einige Substrate wie Salicylamide, Ethinyl-Estradiol oder Morphine konnte nach oraler- oder intraduodener Gabe eine Metabolisierung im Intestinaltrakt bis hin zu 60 % erreicht werden (Koster et al. 1983). Für einzelne Substrate werden sogar die in der Leber gemessenen Aktivitäten übertroffen (Haenninen et al. 1968). Die Aktivitäten nehmen in der Regel von proximal zu distal ab und werden im Colon stark reduziert (Koster et al. 1985). Histologisch werden UGT's in den Epithelzellen der Mucosa nachgewiesen, wobei die Konzentration entlang der Krypt-Villus-Achse kontinuierlich zunimmt. Die stärkste Reaktion bei Induktionsversuchen konnte im Bereich der Krypten festgestellt werden (Dubey et al. 1988). Leider sind die meisten Studien mit den üblichen "Breitbandsubstraten" durchgeführt worden, die von mehreren UGT's gleichzeitig umgesetzt werden. So sind in der Ratte an der Umsetzung des 1-Naphthols drei- und von Estradiol mindestens zwei verschiedene UGT1A-Proteine beteiligt (Tephly et al. 1990). Werden solche Substrate zur Messung der Regulation der Glukuronosyltransferasen eingesetzt, so wird experimentell für die Reaktion nur der Mittelwert für mehrere UGT1A-Proteine auf bestimmte Stimuli gebildet und somit viele vorhandene Effekte verdeckt.

Aufgrund der Organisation des UGT1A-Genortes (Owens et al. 1995), der physiologischen Aktivität von UGT1A-Proteinen und die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse zur gewebespezifischen Expression, scheinen die Glukuronosyltransferasen der Familie vielversprechende Kandidaten der zellulären Protektion und Entgiftung im Gastrointestinaltrakt zu sein.

1.4. Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war eine genaue Charakterisierung aller bisher bekannten UGT1A-Isoenzyme der Ratte in den einzelnen gastrointestinalen Abschnitten. Dabei sollte nicht nur das Expressionsmuster, sondern auch die Expressionshöhe untersucht werden. Durch die Herstellung monospezifischer Antikörper sollten die gefundenen mRNA-Transkripte auf Proteinebene überprüft werden und dazu verwendet werden, eine genauere Lokalisierung der UGT's in den einzelnen Geweben zu erhalten.

Darüber hinaus sollte festgestellt werden, in welcher Weise „klassische Enzyminduktoren“ regulatorischen Einfluß auf die Expression der UGT1A-Isoenzyme in den einzelnen untersuchten gastrointestinalen Abschnitten ausüben. Untersuchungen zur Glukuronidierung sollten erste Hinweise auf die Effektivität der gastrointestinalen Barriere geben, Schadstoffe zu entgiften.

2.1. Material

2.1.1. Versuchstiere, Eukaryontische Zellen, Bakterienstämme

2.1.1.1. Versuchstiere

Für alle Versuche wurden weibliche Wistar Ratten verwendet. Die Tiere stammten aus dem zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover und wurden im Alter von 8 -12 Wochen mit einem Gewicht von 200-300g für die Versuche eingesetzt. Die Tiere wurden bei 22°C in einer sich abwechselnden 12-stündigen Hell-Dunkelphase gehalten und ernährten sich durch eine Haltungsdiät der Firma Altromin GmbH (Lage).

2.1.1.2. Eukaryontische Zellen

Bei der C6-BU-1 Zelllinie handelt es sich um eine Gehirntumorzelllinie eines Wistar-Furth Stammes der Ratte, die 1971 durch eine Nitrosourea-Induktion etabliert wurde und freundlicherweise aus der Abteilung Neurochirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt wurde. Diese Zelllinie zeigte keine Expression der Glukuronosyltransferasen und wurde als Negativkontrolle verwendet.

Die C6-BU-1-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium (Gibco) mit 10% FCS (Gibco), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Seromed); 0,1 U/ml Insulin (Sigma) und 2 mM L-Glutamin im Brutschrank mit 5% CO₂ bei 37°C kultiviert.

2.1.1.3. Bakterienstämme

Bei den TOP10-Zellen handelt es sich um einen E.coli-Stamm, der mit dem pCR 2.1-Vector-Kit der Firma Invitrogen mitgeliefert worden ist. Diese Zellen zeichnen sich durch eine hohe Transfektionseffizienz aus und benötigen kein IPTG zur Induktion.

Zur Transformation und Herstellung großer Mengen des humanen UGT1A1-Proteins wurden kompetente DH5 α -FIQ-Zellen verwendet.

2.1.2. DNA

2.1.2.1. Plasmide

Als Klonierungsvektoren wurden folgende Plasmide verwendet:

- pBR322-GAPDH: Das Plasmid enthielt ein 1,2 kb großes GAPDH-cDNA Fragment, das mit dem Restriktionsenzym PstI herausgeschnitten werden konnte und als Sonde für den Northern Blot verwendet wurde. pBR322 ist ein „low copy“ Plasmid und trägt eine Tetracyclin-Resistenz (Sutcliffe, J.G. 1979).
- pCR2.1.: Dieser Vector stammte aus dem TOPO TA-Cloning-Kit (Invitrogen). Der linearisierte Vektor besitzt an den 5'-Enden ein einzelnes Desoxythymidin (T) als Überhang. Diese Voraussetzung erlaubt eine effektive Ligation von PCR-Produkt und Vektor. Das eingefügte PCR-Produkt wird im Vektor auf beiden Seiten von EcoRI-Schnittstellen flankiert. Ferner enthält der pCR-Vektor den *lac*-Promotor und das *lacZα* -Fragment für blau/weiß-Screening, ein Kanamycin- und Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion. Außerdem sind Bindungsstellen für den M13-Reverse Primer, den M13-Forward Primer und den T7-Promotor vorhanden.
- pQE-30: die pQE-Plasmide gehören zur Familie der pDS Plasmide (Bujard et al.; 1987) und wurden hergestellt aus den Plasmiden pDS56/RBSII und pDS781/RBSII-DHFERS (Stüber et al.; 1990). pQE-30 ist ein bakterieller Expressionsvector, der durch IPTG induziert wird. Er besitzt eine Ampicillin-Resistenz, ein „6x His-tag“ zur Aufreinigung und zeichnet sich durch einen hohen Expressionslevel aus.

2.1.2.2. Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide die für die PCR eingesetzt wurden, sind von der Firma Gibco oder MWG synthetisiert worden.

2.1.3. Chemikalien und Radiochemikalien

2.1.3.1. Chemikalien

Acrylamid-/Bisacrylamid

Roth, Karlsruhe

Agarose (Elektrophoresis Grade)	Gibco BRL, Paisley
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampuwa-Wasser	Fresenius, Bad Homburg
Antibiotika	Sigma, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Bactoagar	Gibco BRL, Paisley
Bacto Hefe Extrakt	Gibco BRL, Paisley
Bacto Pepton	Gibco BRL, Paisley
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Clofibrat	Sigma, Deisenhofen
Chlorophorm	J.T. Baker, Deventer
Coomassie Brillant Blue G250	Merck, Darmstadt
Cornoil	Sigma, Deisenhofen
Dexamethason	Merk, Darmstadt
Dithiotreitol (DTT)	Promega, Mannheim
dNTP`s	Appligene, Heidelberg
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Freund`s Adjuvant (complete and incomplete)	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	J.T. Baker, Deventer
Ethanol	J.T. Baker, Deventer
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Applichem, Darmstadt
Harnstoff	ICN, Aurora
IPTG	Appligene, Heidelberg
Isopropanol	J.T. Baker, Deventer
Lysozym	Applichem, Darmstadt
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol	J.T. Baker, Deventer
Methylcholanthren	Sigma, Deisenhofen

MOPS	ICN, Aurora
Natriumacid	Sigma, Deisenhofen
NaOH	Sigma, Deisenhofen
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Oligo (dT30)	Pharmacia, Uppsala
PBS	Gibco BRL, Paisley
Phenobarbital	Desitin, Hamburg
Phenol	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Paisley
Salzsäure	Riedel-de-Häen, Seelze
Sypro-Orange	Biorad, München
Tris	Applichem, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Serva, Heidelberg
X-Gal	Sigma, Deisenhofen
Xylenyanol	Merck, Darmstadt

2.1.3.2. Radiochemikalien

[³⁵ S] dATP	1000 Ci/mmol	Amersham, Braunschweig
[α- ³² P] dCTP	6000 Ci/mmol	Amersham, Braunschweig
Uridine-Diphosphat-Glucuronic-Acid		
[Glucuronyl-U- ¹⁴ C]	338 mCi/mmol	ICN, Aurora

2.1.4. Molekulargewichtsmarker

2.1.4.1. DNA-Marker

1 kb-Leiter (Gibco)

100 bp-Leiter (Gibco)

DNA „low-less ladder“ zur Mengen-Bestimmung (Gibco)

2.1.4.2. Protein-Marker

Prestained SDS-PAGE-Standards, Low-Range (Biorad)

	<u>MW (daltons)</u>
Phosphorylase B	112,0
Bovine serum albumin	84,0
Ovalbumin	53,2
Carbonic anhydrase	34,9
Soybean trypsin inhibitor	28,7
Lysozym	20,5

2.1.5. Enzyme

Restriktionsendonukleasen	Biolabs, New England
DNase I ; RNase-free	Pharmacia, Uppsala
MMLV-Reverse Transcriptase	Gibco BRL, Paisley
RNasin	Promega, Mannheim
Sequenase	Amersham, Braunschweig
Taq DNA-Polymerase	Gibco BRL, Paisley
T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Leek

2.1.6. Antikörper

Fluorescein (DTAF)-conjugated AffiniPure Goat-Anti-Rabbit IgG, F(ab')₂ Fragment spezifisch (Dianova).

Goat-Anti-rabbit-alkalische Phosphatase Antikörper (Dianova)

Anti-fluorescein, horseradish peroxidase-linked whole antibody (from sheep) (Dianova)

2.1.7. Kommerzielle Kits

ECL-Detection Kit	Amersham, Braunschweig
RNeasy Total RNA Kit	Qiagen, Hilden
Rediprime-Labeling Kit	Amersham, Braunschweig
PCR-Purification Kit	Qiagen, Hilden

2.1.8. Sonstige Materialien

3MM Filterpapier	Whatman, Meckenheim
Filmkassetten	Kodak, Frankfurt a. M.
Röntgenfilme	Kodak, Frankfurt a. M.
Screen mit Kassette für Phosphoimager	Fuji, Raytest, Straubenhardt
Zentrifugenröhrchen, steril (5+10 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen	Greiner, Nürtingen
Kulturplatten	Greiner, Nürtingen
Hybond N+Membran für Northern Blot	Amersham, Braunschweig
Membran für Western Blot	Millipore, Bedford
Plastikfolie	Jürgens, Gehrden

2.2. Methoden:

2.2.1. Klonierungstechniken

2.2.1.1. Vermehrung von transformierten Bakterien

Ein Bakterienstamm, der einem Glycerolstock oder einem gepickten Klon einer Selektionsagarplatte entstammte, wurde als Vorkultur (2-5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum) über Nacht bei 37°C und 225 Upm im Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde 1:10 mit frischem Medium verdünnt und weitere 6-8 Stunden bei 37°C und 225Upm geschüttelt. Anschließend wurde eine neue 1:10 Verdünnung mit frischem LB-Medium angesetzt und über Nacht wie oben beschrieben kultiviert.

Für DNA-Minipräparationen wurden 1,5ml einer Übernachtskultur benötigt, für DNA-Maxipräparationen entweder 200ml bei Plasmiden mit hoher Replikationsrate (high-copy-plasmids; z.B. pQE) oder 500ml bei Plasmiden mit niedriger Replikationsrate (low-copy-plasmids; z.B. pBR).

<u>LB-Medium</u>			<u>Antibiotika</u>		
10	g	Bacto-Pepton	Ampicillin	100	µg/ml
5	g	Bacto-Hefe-Extrakt	Kanamycin	10	µg/ml
10	g	NaCl	Tetracyclin	10	µg/ml
x	ml	dH ₂ O auf 1Liter auffüllen			

2.2.1.2. Anlegen eines Glycerolstocks

Um transformierte Bakterien auf Dauer lagern zu können, wurde ein Glycerolstock angelegt. Dazu wurden 600µl einer Übernachtskultur (Selektions-LB-Medium) mit 600µl 50 %-igem Glycerol gemischt und bei -80°C gelagert.

2.2.1.3. Plasmidisololation

2.2.1.3.1. Maxipräparation

Große Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurde durch alkalische Lyse der Bakterien gewonnen (Birnboim et al., 1979). Die Isolierung erfolgte mit dem Maxi-Plasmid-Kit der Firma Qiagen. 200ml Zellsuspension einer Übernachtskultur wurde für 15min (Beckmannzentrifuge, bei 10000g, 4°C) zentrifugiert. Das Medium wurde nun vollständig abgenommen und die Zellen in 10ml Puffer1 suspendiert. Nach Zugabe von 10ml Puffer2 wurden die Zellen alkalisch lysiert und bei RT für 5min inkubiert. Anschließend wurden 10ml Puffer3 zugegeben, vorsichtig geschüttelt und 20min auf Eis gestellt. Es folgte eine Zentrifugation (Beckmannzentrifuge) für 30min, 4°C bei 20000g. Die im Überstand freigesetzte Plasmid-DNA wurde über einen Anionenaustauscher durch 2x Waschen mit QC-Puffer aufgereinigt. Es folgten eine Elution (QF-Puffer) und eine Fällung mit 0,7 Vol. Isopropanol. Erneut wurde nun bei 4°C und 15000g für 30min zentrifugiert (Beckmannzentrifuge) und das Pellet mit 70 %-igen Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde in TE-Puffer aufgenommen und bei -80°C gelagert. Die Ausbeute an Plasmid-DNA lag zwischen 50-500 µg.

Puffer1

50	mM	Tris-HCl, pH 8,0
10	mM	EDTA
0,4	µg/ml	RNase

Puffer2

0,2	M	NaOH
1	%	SDS

Puffer3

2,5	M	KAcetat pH 4,8
-----	---	----------------

TE-Puffer

10	mM	Tris-HCl, pH 8,0
1	mM	EDTA, pH 8,0

Die Bestimmung der Plasmidkonzentration erfolgte im Spektralphotometer (Pharmacia Ultraspec 3000). Es konnten 50µl einer gereinigten DNA-Verdünnung in einer Quarzküvette gemessen werden. Die Definition zur Berechnung der DNA-Konzentration ist:

$$A_{260} \text{ von } 1 = 50 \mu\text{g/ml (spezifischer DNA-Faktor)}$$

Unter Bildung des Quotienten $E_{280} \text{ nm} / E_{260} \text{ nm}$ wurde die Reinheit der DNA-Lösungen bestimmt. Dieser Wert sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.1.3.2. Minipräparation

Mit dieser Methode wurden kleine Mengen neuklonierter Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienzellen isoliert, um damit anschließend im Restriktionsverdau oder mittels Sequenzierung die Klonierung zu überprüfen.

1,5ml einer Übernachtskultur (s. 2.2.1.1.) wurde in ein Eppendorfreaktionsgefäß gefüllt und 1min. bei 10000g zentrifugiert (Tischzentrifuge; Eppendorf), um die Bakterien zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 250µl STET-Puffer, mit 10µl Lysozym (10mg/ml) versetzt, resuspendiert und 40 sek. bei 95°C erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz 20min. bei 4°C und 10000g zentrifugiert. Nun wurde das Pellet mit einer sterilen Pipetenspitze entfernt, um den Überstand mit 250µl Isopropanol zu fällen. Dann wurde das Pellet erneut bei 4°C und 10000g, 10min. zentrifugiert und zweimal mit je 250µl 70 %-igem Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet bei Raumtemperatur etwa 15min. getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde im Anschluß daran in 30µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und 15min. bei 65°C inkubiert. Die Minipräp-DNA konnte bei -20°C gelagert werden.

STET-Puffer

100	mM	NaCl
10	mM	Tris-Puffer, pH 8,0
1	mM	EDTA
5	%	Triton X-100

2.2.1.4. Restriktionsverdau der Plasmide

DNA-Fragmente werden aus Plasmiden durch Restriktionsenzyme an genau definierten Stellen herausgeschnitten.

Restriktionsansatz ad 20 μ l

1-2	μ g	Plasmid
10	U	Restriktionsenzym A und/oder B
1	μ l	10x Restriktionspuffer, entsprechend den Restriktionsenzymen
x	μ l	dH ₂ O auf 20 μ l auffüllen

$$\Sigma = 20\mu\text{l}$$

Der Restriktionsansatz wurde für 1-2 Stunden bei der entsprechenden Temperatur im Heizblock inkubiert. Zum Inaktivieren der jeweiligen Restriktionsenzyme wurde der gesamte Ansatz nochmals für 10min. bei 65°C im Heizblock (Eppendorf) inkubiert.

2.2.1.5. Isolation und Reinigung der DNA-Fragmente

Im Anschluß an einen Restriktionsverdau wurde das zu isolierende DNA-Fragment elektrophoretisch in einem 1-2 %-igen Agarose-TAE-Gel von den übrigen Banden getrennt. Die DNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Größe der Fragmente wurde durch Vergleich mit den Standardbanden eines 100 bp DNA- oder 1 kb DNA-Größenmarkers ermittelt. Anschließend wurden die jeweiligen Fragmente aus dem Gel geschnitten und mit einem Agarose-Gel-Extraktions-Kit der Firma Qiagen aufgereinigt. Die Agarose wurde dabei aufgelöst, und die DNA lagerte sich an die Glaspartikel (Qiaex II Silicagel Particles). Nach dem Waschen mit Puffern verschiedener Salzkonzentrationen wurde die DNA mit TE-Puffer von den Glaspartikeln eluiert und bei -20°C gelagert.

TAE-Puffer (50 x), ad 1000ml

242	g	Tris-Base
57,1	ml	Essigsäure
37,2	g	Na ₂ EDTA*2H ₂ O

2.2.1.6. Bestimmung der DNA-Fragmente

Das gereinigte Fragment wurde neben unterschiedlichen Konzentrationen des 1 kb DNA-Größenmarkers (Gibco) oder des „low less ladder“ (Gibco) in einem 1-2 %-igen ethidiumbromidgefärbten Agarose-Gel aufgetrennt. Durch optischen Vergleich der Fragmentbanden mit den Größenmarkern, wurde die DNA-Menge abgeschätzt, wobei die 1016pb-Bande des 1 kb Größenmarkers so verdünnt wurde, daß sie 1/10 der Gesamtkonzentration entsprach.

2.2.1.7. Ligation von PCR-Produkten in den pCR 2.1.-Vektor und Kolonieselektion

Die Ligation spezifischer PCR-Amplifikate wurde mit Hilfe des TA-Cloning-Kits der Firma Invitrogen durchgeführt. Der TA-Cloning-Kit macht die direkte Insertion eines PCR-Produktes in einen Plasmidvektor möglich.

Die Taq-Polymerase besitzt eine Matrizen-unabhängige Aktivität, wodurch ein einzelnes Desoxyadenosin (A) an die 3`- Enden des PCR-Produkts angehängt wird. Der linearisierte Vektor in diesem Kit hat an den 5`- Enden ein einzelnes Desoxythymidin (T) als Überhang. Diese Voraussetzung erlaubt eine effektive Ligation von PCR-Produkt und Vektor. Das eingefügte PCR-Produkt wird im Vektor auf beiden Seiten von EcoRI-Schnittstellen flankiert. Ferner enthält der pCR-Vektor den *lac*-Promotor und das *lacZα* –Fragment für blau/weiß-Screening, ein Kanamycin- und Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion. Außerdem sind Bindungsstellen für den M13-Reverse Primer, den M13-Forward Primer und den T7-Promotor vorhanden.

Für die Ligation sollte immer ein frisches PCR-Produkt verwendet werden, da sonst bei längerer Lagerung das überhängende Desoxyadenosin (A) abgespalten werden könnte.

Ligationsansatz

1-2µl	PCR-Amplifikat (10ng/µl)
2µl	Vector pCR 2.1.
1µl	10x Ligationspuffer
1µl	T4-DNA-Ligase
<u>5µl</u>	<u>dH₂O</u>
Σ =	10µl

Das zur Klonierung verwendete Plasmid weist neben einem Ampicillin-Resistenzgen ein Lac⁺Z-Gen auf, das einen Teil der β -Galactosidase, den Peptidanteil, codiert. E.coli-Stämme, denen das chromosomale *LacZ⁻*-Gen fehlt, können β -Galaktosidase nur bilden, wenn sie ein Plasmid tragen, das den fehlenden *LacZ⁻*-Teil des Gens enthält. Beim Klonieren wird das *LacZ*-Gen, das den Polylinker enthält, inaktiviert. Auf ampicillinhaltigem Agar werden die Transformanten auf β -Galaktosidase-Aktivität ausgemustert, wobei das Lactoseanalogon X-Gal durch die synthetisierte β -Galaktosidase der nicht rekombinierten Klone zu einem dunkelblauen Reaktionsprodukt abgebaut wird. Die blauen Kolonien enthalten das Ursprungplasmid und die weißen Kolonien dagegen ein rekombinantes Plasmid. Letztere werden mit einer sterilen Pipettenspitze abgenommen und zur Kultivierung über Nacht in 5ml LB-Amp-Medium überimpft.

2.2.1.8. Transformation

Der gesamte Ligationsansatz wurde mit 100 μ l auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen (E.coli TOT10) vorsichtig vermischt und 30min auf Eis belassen. Die Zellen wurden dann für 30 Sekunden einem Hitzschock unterzogen und anschließend für 2min. auf Eis abgekühlt. Danach konnte dem Ansatz 250 μ l SOC-Medium hinzugefügt werden, das vorher auf 37°C temperiert worden war. Im Anschluß daran wurden die Zellen für 1 Stunde unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Ausplattierung von jeweils 100 μ l des Transformationsansatzes erfolgte auf LB-Amp-Agar-Platten, denen vorher 40 μ l X-Gal (40mg/ml in Dimethylformamid) zugesetzt wurden. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.9. Sequenzierung

Die Nukleotidsequenz der klonierten Fragmente wird mittels des modifizierten Verfahrens von Sanger et. al., 1977 mit Hilfe des *Sequenase Version 2.0. DNA Sequencing Kit* der Firma Amersham ermittelt. Bei dieser Methode wird eine in vitro DNA-Synthese durch die T7-DNA-Polymerase (Sequenase) nach Initiierung durch einen spezifischen komplementären Sequenzprimer durchgeführt. Während der DNA-Synthese wird ³⁵S α -ATP in den neusynthetisierten Strang eingebaut. Die Termination der DNA-Synthese erfolgt durch Zusatz spezifischer Di-Desoxynukleotide (ddNTP's), die einen Abbruch der Kettenverlängerung bewirken.

Da der Einbau der ddNTP's mit statistischer Wahrscheinlichkeit erfolgt, ist nach Abschluß der Reaktion praktisch in jeder Position der DNA-Sequenz ein Kettenabbruch erfolgt. Anschließend werden die Fragmente unter denaturierenden Bedingungen entsprechend ihrer Länge in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht.

Denaturierung

3-5µg DNA wurden in 8µl H₂O aufgenommen und mit 2µl 2 M NaOH für 10min. bei Raumtemperatur inkubiert. 100ng M13-Primer wurden in 7µl H₂O gelöst und zu dem Ansatz pipettiert. Nach der Neutralisation mit 3µl 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,8) wurde die DNA durch Zusatz von 75 %-igem Ethanol über Nacht bei -20°C präzipitiert. Die gefällte DNA wurde 30min. bei 4°C und 10000g abzentrifugiert, einmal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und anschließend 15min. getrocknet.

Sequenzreaktion

Die DNA wurde in 10µl 1x Sequenasepuffer aufgenommen. Dazu wurde bei Raumtemperatur 6µl eines Labelling-Mixes (Amersham) pipettiert.

6µl Labelling-Mix

1µl	0,1 M DTT
1µl	³⁵ S α-ATP
2µl	verdünnter Labelling-Mix (1x)
2µl	verdünnte Sequenase (1:8)

Termination

In einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 2,5µl des entsprechenden Terminations-Mixes (ddG, ddA, ddC, ddT) vorgelegt.

Nach Zugabe des Labelling-Mixes zur DNA fand eine Inkubation für 5min. bei RT statt. Dann wurden 3,5µl dieses Markierungsansatzes zum Terminations-Mix pipettiert. Der Ansatz wurde 10min. bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeitspanne konnten alle begonnenen Extensionen zu Ende, d.h. bis zum Einbau eines Didesoxynukleotids, ablaufen. Durch Zugabe von 4µl Stop-Mix wurden die Reaktionen beendet. Der Stop-Mix enthält als Marker Bromphenolblau und Xylenyanol, die während des Gellaufes als Orientierung dienen.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Reaktionsansätze wurden 3min. bei 95°C erhitzt und dann sofort auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (Dicke: 0,4mm) bei 80W ca. 3 Stunden in einer vertikalen Elektrophoresekammer aufgetrennt. Als Laufpuffer befanden sich im oberen Reservoir 500ml 0,5x TBE-Puffer, im unteren Reservoir 250ml 1x TBE-Puffer. Um eine bessere Auftrennung im unteren Bereich des Gels zu erhalten, wurde kurz vor dem Auslaufen der Bromphenolblau-Lauffront in das untere Reservoir 75ml 3M Natriumacetatlösung hinzugefügt. Die Natriumacetatlösung sowie die unterschiedlichen Ionenstärken der beiden Laufpuffer bewirkten, daß die Fragmente nicht so schnell aus dem Gel auslaufen können und somit eine Sequenz von ca. 100-150 bp lesbar wurde.

8 %-iges denaturierendes Polyacrylamidgel

15	ml	40 %-ige Acryl-/Bisacrylamidlösung
15	ml	5x TBE-Puffer
31,5	g	Harnstoff
x	ml	dH ₂ O, um den Ansatz auf 75ml aufzufüllen
75	µl	TEMED
375	µl	10 %-iges APS

TBE-Puffer (5x), ad 1000ml

54,0	g	Tris-Base
27,5	g	Borsäure
20	ml	0,5 M EDTA pH 8,0
x	ml	dH ₂ O, um den Ansatz auf 1000ml aufzufüllen

Fixierung des Gels

Das Polyacrylamidgel wurde mit einer Lösung aus 10 % Methanol und 10 % Essigsäure 10min. fixiert, dann auf zwei Whatman-Papiere überführt, um schließlich 2 Stunden auf einem Gelrockner bei 80°C getrocknet zu werden.

Autoradiographie

In einer Röntgenkassette wurde ein Autoradiographiefilm (Kodak) auf dem getrockneten Gel über Nacht bei Raumtemperatur exponiert.

2.2.2. Quantitativer Nachweis der Proteine durch Antikörper

2.2.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die Proteine wurden bei der Probenvorbereitung in SDS-Probenpuffer denaturiert und in Polyanionen überführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch Gelelektrophorese in denaturierenden SDS-Gelen aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte. Sie wurden als Proteinbanden dargestellt. Die molekulare Größe der Proteine wurde im direkten Vergleich mit einem kalibrierten Molekulargewichtsstandard bestimmt (Laemmli et al., 1970).

20µg Protein wurde mit dH₂O auf 20-40µl Gesamtvolumen aufgefüllt, mit 3 x SDS-Auftragspuffer versetzt und 5min. bei 95°C denaturiert. Die Ansätze sowie 5µl denaturierter Molekulargewichtsstandard wurden auf ein 10%-iges SDS-Gel aufgetragen. Die Polymerisation wurde jeweils bei Raumtemperatur in Gegenwart von Ammoniumperoxidisulfat (APS) und N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED) durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 60V im SDS-Laufpuffer und bei konstanten 130V im Trenngel bis die Bromphenol-Blue-Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte.

10 %-iges Trenngel, ad 30ml

10	ml	30 % Acrylamid
7,5	ml	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
12,2	ml	dH ₂ O

5 %-iges Sammelgel, ad 5ml

0,85	ml	30 % Acrylamid
0,625	ml	1 M Tris-HCl, pH 6,8
3,47	ml	dH ₂ O

300	µl 10 %-iges APS-Lsg.	50	µl 10 %-iges APS-Lsg.
30	µl TEMED	5	µl TEMED

10 x SDS-Laufpuffer, ad 1 Liter

30,3	g Tris Base (250 mM)
144	g Glycine (1,92 M)
10	g SDS (1 %)

3x SDS-Page-Auftragspuffer, ad 10ml

1,5	ml 1 M Tris, pH 6,8 (150 mM)
3	ml 20 %-ige SDS-Lsg. (6%)
150	µl 1 M DTT (15 mM)
3	ml 100 %-iges Glycerol (30%)
0,025	g Bromphenol-Blau (0,25%)

2.2.2.2. Western Blot

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine werden unter elektrischer Spannung aus dem Gel auf eine Nylon-Membran transferiert und kovalent gebunden. Diese Methode wurde von Burnette et al., 1981 entwickelt. Der Proteintransfer findet im nassen Milieu statt. Die Proteine können dann mit spezifischen, gegen sie gerichteten primären Antikörpern, an die wiederum sekundäre Alkalische-Phosphatase- oder horseradish-peroxidase-gekoppelte-Antikörper anlagern. Der horseradish-peroxidase-gekoppelte-Antikörper kann in einer Licht emittierenden Reaktion auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden. (ECL-Western-Blot Analysis-System -Enhanced Chemilumineszenz, Amersham). Beim alkalische-Phosphatase-gekoppelten-Antikörper findet der Nachweis anhand einer Farbreaktion statt.

Die Proteine wurden mit Hilfe eines SDS-Polyacrylamidgels elektrophoretisch aufgetrennt und in einer Standard-Naßblotkammer auf eine Nylon-Membran transferiert. Das Gel zeigte zur Kathodenseite, die Membran zur Anodenseite (Maniatis et al., 1989). Der Proteintransfer im Transferpuffer wurde bei Raumtemperatur und konstanten 600mA über 3 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde der Blot etwa 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 5% Magermilchpulver (Sigma) in Waschpuffer gegen unspezifische Bindungen abgesättigt. Es folgte eine einstündige Inkubation auf dem Schüttler mit dem spezifischen primären Antikörper im Waschpuffer. Danach wurde der Blot mit Waschpuffer intensiv gewaschen und erneut für 1 Stunde mit einem 1: 10000 verdünnten sekundären Antikörper schüttelnd inkubiert.

Alkalische-Phosphatase-gekoppelter-Antikörper: Der Blot wurde erneut mehrmals gewaschen, wobei das letzte zweimalige waschen mit Alkaline-Phosphatase-Puffer für jeweils 5min. erfolgte. Anschließend wurde das Substrat der alkalischen Phosphatase 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP oder auch X-Phosphat genannt), das zusammen mit Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid (NBT) einen unlöslichen blaugrünen Niederschlag an den Orten der Enzymaktivität ergibt, im Verhältnis 2:1 in 10ml Alkaline-Phosphatase-Puffer zugegeben. Nachdem die Banden gut sichtbar waren, wurde die Reaktion mit dH₂O abgestoppt.

Horseradish-peroxidase-gekoppelter-Antikörper: Dieser sekundäre Antikörper konnte in der ECL-Detektionslösung (Amersham) in einer Licht emittierenden Reaktion auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden.

Transferpuffer, pH 8,3; ad 5000ml

14,5 g Glycine (39 mM)
 29 g Tris-HCL (48 mM)
 1,85 g SDS (0,037 %)
 1000 ml Methanol (20 %)

Alkaline-Phosphatase-Puffer, ad 50ml

0,3 g NaCl (100 mM)
 0,05 g MgCl₂ (5 mM)
 0,61 g Tris-HCL, pH 9,5
 (100 mM)

Waschpuffer (TBS-Tween), pH 7,6; ad 5000 ml

12,1 g Tris-HCL (20 mM)
 40 g NaCl (137 mM)
 19 ml 1 M HCL
 5 ml Tween 20 (0,1 %)

NBT

0,5 g NBT
 10 ml 70 %Dimethylformamid

BCIP

0,5 g BCIP
 10 ml 100 % Dimethylforamid

2.2.2.3. Proteinfärbung in SDS-Gelen

2.2.2.3.1. Gelfärbung mit Coomassie-Brillant-Blue G250

Die im Polyacrylamidgel durch Elektrophorese aufgetrennten Proteine wurden durch den Proteinfarbstoff Coomassie-Brillant-Blue G250 sichtbar gemacht. Die Farbtiefe der entstandenen Proteinbanden ist der aufgetragenen Proteinmenge ungefähr proportional. Die Nachweisgrenze liegt im Bereich von 0,1-2 µg Protein pro Bande. Dadurch lassen sich die Proteinmengen quantitativ optisch gut abschätzen. Eine Ladungskontrolle der aufgetragenen Proteinmenge ist so möglich.

Die SDS-Gele wurden nach der Elektrophorese in Coomassie blue-Lösung gefärbt (Meyer u. Lamberts et al., 1965).

Die Färbelösung diente gleichzeitig dem Fixieren der Proteine. Während des Färbeprozesses wurde die Schale auf dem Schüttler leicht bewegt. Gefärbt wurden die Gele mindestens eine Stunde. Anschließend wurden die Gele bis zum Erreichen eines klaren Hintergrundes in Entfärbelösung gelegt. Um die Entfärbung zu beschleunigen, wurde die Entfärbelösung gewechselt.

Färbelösung für Coomassie, ad 100ml

15	ml	Essigsäure
40	ml	Methanol
45	ml	dH ₂ O
0,2	g	Coomassie-Farbstoff

Entfärbelösung, ad 100ml

15	ml	Essigsäure
40	ml	Methanol
45	ml	dH ₂ O

2.2.2.3.2. Sypro-Orange Färbung

Die Essigsäure in der Coomassie-Färbelösung sorgt für eine Fixierung der Proteine im Gel und verhindert somit ein anschließendes Blotting auf eine Membran oder ein Eluieren der Proteine. Aus diesem Grund wurden Proteine, die anschließend eluiert werden sollten, in einer Sypro-Orange-Lösung der Firma Biorad unter Verwendung von UV-Licht (302nm) im Gel sichtbar gemacht. Dabei wurde das SDS-Gel für 30min in 0,05% SDS, 7,5% Essigsäure und 100µl Sypro-Orange gefärbt.

2.2.2.4. Mikrosomenpräparation

Etwa 200mg Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff zerkleinert und in einen Dounce- Homogenisator mit 1ml eiskalten PufferI überführt. Das Gewebe wurde homogenisiert und anschließend einer Zentrifugation (Beckman J2-21; Rotor JA 21; 10000g bei 4°C und 5 min.) zur Entfernung der Zellkerne und der Mitochondrien unterzogen. Der Überstand wurde gesammelt, das Pellet erneut in 500ml kalten PufferI aufgenommen und abzentrifugiert. Beide Überstände wurden dann durch eine Ultrazentrifugation (Beckman Minifuge; Rotor TL100; 45000rpm für 1 Stunde bei 4°C) in ein mikrosomales Pellet und einem Überstand aus löslichen Proteinen aufgetrennt. Das Pellet wurde in 200µl kaltem PufferI resuspendiert und die Proteinmenge nach Bradford (s.2.2.2.5.) bestimmt. Die Lagerung der Proben fand bei -80°C statt.

PufferI

50	mM	Tris-HCl; pH 7,4
10	mM	MgCl ₂

2.2.2.5. Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradfordassay)

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford et al., 1976 bestimmt. Zuerst wurde eine 1:5 Vorverdünnung des Biorad-Dye-Reagent-Concentrate mit dH₂O hergestellt. Anschließend wurde das verdünnte Protein dazugegeben und sofort gemischt. Die Blaufärbung der Proben wurde bei 595 nm im Spektralphotometer (Pharmacia) gemessen und über eine Eichreihe wurde mit BSA (1mg/ml) die Proteinkonzentration bestimmt. Da die Reaktion nur innerhalb eines begrenzten Konzentrationsbereiches linear verläuft, mußten die Verdünnungen so gewählt werden, daß die Proteinkonzentrationen innerhalb dieses Bereiches lagen.

2.2.2.6. Affinitätsaufreinigung mikrosomaler Proteine

Um Kreuzreaktionen der Anti-UGT 1A-Antikörper mit UGT's der Familie 2 zu vermeiden, wurden vor dem Western-Blot die UGT's durch eine Immunpräzipitation gereinigt. 2mg Mikrosomen wurden in RIPA-Puffer lysiert und mit 5µl des Antikörpers versetzt, der spezifisch

fisch den C-Terminus und somit alle UGT 1A-Proteine erkennt. Der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex wurde an 50µl Protein A (BioRad) gebunden. Die nicht gebundenen Proteine wurden durch 4 maliges Waschen der Protein A-Agarose-Partikel mit RIPA-Puffer entfernt. Zum Entfernen der Detergenzien und des NaCl wurde ein fünfter Waschgang mit 50mM Tris-HCl, pH 6,8 durchgeführt und die Agarosepartikel im Probenpuffer (jedoch ohne Reduktionsmittel) für 5min. aufgekocht. Durch den Verzicht auf ein Reduktionsmittel werden die Disulfidbrücken der Antikörper nicht reduziert, so daß diese ein Molekulargewicht von 150kD aufweisen und mit der Detektion der UGT's im Western-Blot bei 55kD nicht interferieren. Nach dem Denaturieren der Proben wurden diese in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit dem spezifischen Antikörper im Exon1 der UGT's im Western-Blot mit dem ECL-System nachgewiesen.

RIPA-Puffer

50	mM	Tris-HCl, pH 8,0
150	mM	NaCl
0,1	%	SDS
1	%	Nonidet P-40
0,5	%	Natriumdesoxycholat
1	mM	PMSF

2.2.2.7. Immunfluoreszenz

Kleine Gewebestücke der unter **2.2.3.1.** entnommenen Organe wurden in Tissue-Tec eingelegt und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Mit Hilfe des Mikrotoms wurden aus diesen Blöcken 5µm dicke Gefrierschnitte hergestellt. Die Seren aus **2.2.7.** wurden 1:40, 1:80 und 1:160 mit PBS vorverdünnt. Die Gefrierschnitte wurden für 40-45 Minuten mit diesem 1. Antikörper (monospezifische Antikörper aus den Seren) in einer feuchten und dunklen Kammer inkubiert. Nach gründlichem Waschen werden die Schnitte mit dem 2. Antikörper (Goat-Anti-Rabbit-IgG DTAF-markiert, 1:100 verdünnt in PBS) für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten und dunklen Kammer inkubiert.

Die in PBS gewaschenen Schnitte wurden in ein Glycerol/H₂O-Gemisch (1:9) eingedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.2.3. Gewinnung der RNA aus Gewebe

2.2.3.1. Induktionsversuche

Sämtliche Induktionsversuche wurden an 8-12 Wochen alten weiblichen Wistar Ratten mit einem Gewicht von 200-300g durchgeführt. Verwendet wurden 4 klassische Enzyminduktoren für P450-Cytochrome, die alle in 24-stündigen Abständen intraperitoneal (i.p.) injiziert wurden. Nach der letzten Injektion mußten die Tiere 12 Stunden hungern und wurden dann durch einen Kehlschnitt getötet. Anschließend wurden die benötigten Organe entnommen, der gesamte Gastro-intestinaltrakt gründlich mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) gespült und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Aufarbeitung wurden die Organe bei -80°C gelagert.

Enzyminduktoren:

Methylcholanthren (MC) :	40mg/kg MC gelöst in 1ml Cornoil	über 3 Tage
Dexamethason (Dex) :	80mg/kg Dex gelöst in 1,8ml NaCl 0,9%	über 3 Tage
Phenobarbital (PB) :	80mg/kg PB gelöst in 0,5ml NaCl 0,9%	über 4 Tage
Clofibrate (CL) :	300mg/kg CL gelöst in 0,7ml Cornoil	über 7 Tage

Das Methylcholanthren mußte vor der Injektion 30-40 min. bei 42°C im Heizblock in Cornoil gelöst werden. Die Kontrolltiere wurden dementsprechend nur mit Cornoil oder 0,9 %-iger physiologischer Kochsalzlösung behandelt.

2.2.3.2. Extraktion von RNA

Sämtliche RNA-Präparationen wurden mit dem RNA-Midi-Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Dazu wurden bis maximal 250 mg gefrorenes Gewebe in β -Mercaptoethanol versetztem GITC-Puffer (Guanidinium-Isothiocyanat, Qiagen) mit einem Ultraturrax homogenisiert. Im Anschluß daran wurde nicht gelöstes Material durch eine Zentrifugation [bei 4°C und

3000g, 25 Minuten (Beckman GS-614R)] entfernt. Das Lysat wurde mit 70 %-igem Ethanol versetzt, auf die Säulenmatrix aufgegeben und diesmal 10 Minuten (bei 3000g und Raumtemperatur) zentrifugiert. Die gebundene RNA wurde durch mehrere Waschschriffe von Kontaminationen befreit und anschließend zweimal mit je 250µl DEPC-Wasser eluiert. Die Ausbeuten an RNA waren abhängig vom aufgeschlossenen Material und schwankten zwischen 250µg/mg aus Lebergewebe und nur 25µg/mg Gewebe vom Oesophagus. Die Gesamt-RNA wurde bei 260nm im Spektralphotometer (Pharmacia) quantifiziert. Die Verhältnisse OD_{260}/OD_{280} lagen stets zwischen 1,8 und 2,0. Zusätzlich wurde die Qualität der RNA in einem 1 %-igem, ethidiumbromidgefärbten Agarosegel überprüft.

Definition der Berechnung der RNA-Konzentration:

$$A_{260} \text{ von } 1 = 40\mu\text{g/ml (spezifischer RNA-Faktor)}$$

$$A_{260} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{spez. RNA-Faktor} = x \mu\text{g} / \text{ml RNA}$$

Unter Bildung des Quotienten $E_{280} \text{ nm} / E_{260} \text{ nm}$ wurde die Reinheit der RNA-Lösungen bestimmt. Dieser Wert sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.4. PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR = polymerase chain reaction) werden aus geringsten Mengen DNA *in vitro* definierte Abschnitte exponentiell vermehrt (Saiki et al., 1988; Mullis and Faloona 1987). Die hierzu verwendete hitzestabile Taq-DNA-Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*. Sie synthetisiert, wenn ein kurzer Doppelstrang vorhanden ist, einen neuen DNA-Strang komplementär zum alten einzelsträngigen Matrizen-Strang, wobei ihr Temperaturoptimum bei 72°C liegt. Außerdem wird sie bei 95°C nicht denaturiert.

Für die zyklische Amplifikation von definierten DNA-Abschnitten benötigt man sequenzspezifische Oligonukleotide, die zu jeweils einem Abschnitt der beiden Stränge der Matrizen DNA („Template“) komplementär sind. Diese „sense“- und „antisense“-Primer schließen die zu amplifizierende DNA-Sequenz ein und sollten möglichst 20-30 Nukleotide lang sein.

Außerdem sollten die als Primer verwendeten Oligonukleotide ein ausgewogenes G/C- zu A/T-Verhältnis und eine ähnliche Schmelztemperatur aufweisen. Zur Abschätzung der T_m in einer 1 M Na^+ -Lösung kann folgende Formel benutzt werden (Thein and Wallace 1986). :

$$T_m = [4x (\text{Anzahl der G + C Basen}) + 2x (\text{Anzahl der A + T Basen})] \text{ } ^\circ\text{C}$$

Zusätzlich zum DNA-„Template“ (Matrize), der Taq-DNA-Polymerase und den Primern werden für die PCR noch Desoxynukleotid-5'-triphosphate (dNTP's) und ein Mg^{2+} -haltiger Puffer benötigt. Ein PCR-Zyklus unterteilt sich in folgende drei Reaktionsabschnitte:

1. Die doppelsträngige DNA wird bei 95°C aufgeschmolzen, und es entstehen Einzelstränge. (**Denaturierung**).

2. Die Primer hybridisieren mit dem jeweiligen komplementären Strang (**Annealing**). Dies geschieht nach der Denaturierung durch schnelles Abkühlen auf eine ausgewählte Temperatur von $45\text{-}72^\circ\text{C}$. Die tatsächliche Annealing-Temperatur sollte dabei ca. $4\text{-}5^\circ\text{C}$ unter der errechneten Schmelztemperatur (T_m) der Primer liegen.

3. Es folgt nun die Synthese der komplementären DNA-Stränge durch die Taq-DNA-Polymerase bei 72°C (**Elongation**). Die Länge der Elongationszeit richtet sich nach der Größe der zu amplifizierenden DNA-Fragmente (30s.-5min.). Dieser Zyklus wird im allgemeinen 25-40 mal wiederholt, worauf dann ein letzter Elongationsschritt von 7-10 min. folgt.

Alle in dieser Arbeit durchgeführten PCR's wurden in einem Robocycler der Firma Stratagene durchgeführt. Dieses Gerät besitzt einzelne Blöcke und einen Temperaturgradienten, der es möglich machte, alle UGT1A-Primer trotz unterschiedlicher Annealingtemperaturen gleichzeitig in einem Lauf zu testen.

2.2.4.1. Auswahl der Primer für die PCR zur Unterscheidung der UGT 1A-Isoenzyme

Zur Auswahl der Primer wurde ein Alignment der DNA-Sequenzen der verschiedenen Exons1 des UGT1A-Genkomplexes durchgeführt. Die einzelnen Primer wurden stets in den variablen Regionen der Exons1 so ausgewählt, daß die Sequenzhomologie zwischen den einzelnen Exons1 so gering war, daß eine Unterscheidung der jeweiligen Isoenzyme eindeutig

möglich war. Alle für die PCR verwendeten Primer, mit den dazugehörigen Annealingtemperaturen, der UGT1A-Proteine sind in **Tabelle 1** aufgelistet.

Tabelle 1: Primer zur Unterscheidung der UGT 1A-Isoenzyme

UGT	Sequenz	Annealing	Transkriptgröße
1A1-8F 1A1-381R	5`tggtgtgccggagctcatgttcg 3` 5`agacagcagcactactggagtccc 3`	60°C	375 bp
1A2-13F 1A2-328R	5`ttgtgtgcacccttcgaggactc 3` 5`agaaagtcttcacaaaatgttggtg 3`	61°C	316 bp
1A3-303F 1A3-690R	5`atctctgaagttagtctacag 3` 5`tctgccagagagccataattaac 3`	58°C	388 bp
1A4-285F 1A4-666R	5`gaatgaatctctgtgatgatgtc 3` 5`gaaaggcgtcggacactgagcg 3`	59°C	382 bp
1A5-11F 1A5-318R	5`atgtgacctgcaaggattagctg 3` 5`tgtctcacatagttgcctgttca 3`	64°C	309 bp
1A6-21F 1A6-338R	5`tgctcgacttctgcaggettcc 3` 5`tcctgtactctcttagaggagcca 3`	62°C	318 bp
1A7-186F 1A7-354R	5`cagttggcagctgggaaaacca 3` 5`gaagaaacctgggcagggcta 3`	63°C	169 bp
1A8-191F 1A8-3344R	5`ggcacatgggaaagtcgttga 3` 5`ccttgctgaatgcttcag 3`	56°C	153 bp
1A9-487F 1A9-662R	5`ctccatcagtcacttagcaaaa 3` 5`gagcaaatgcacgttctcaaaa 3`	57°C	176 bp
GAPDH-F586 GAPDH-R1037	5`accacagtcctgcatcac 3` 5`tccaccacctgttgctgta 3`	55°C	452 bp

2.2.4.2. Herstellung genomischer DNA

Etwa 1g Lebergewebe einer weiblichen Wistar Ratte wurde in flüssigem Stickstoff zermört mit einem Verdauungs-Puffer versetzt (1,2ml pro 100mg/Gewebe) und über Nacht verdaut. Es folgte eine Extraktion der DNA mit 25:24:1 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol.

Die wässrige Phase wurde nun mit 1/2 vol. 7,5 M Ammoniumacetat und 2 Vol. 100 %-igem Ethanol präzipitiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge, 1700g für 2min.) wurde das Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde dann in TE-Puffer aufgenommen und mehrere Stunden bei Raumtemperatur vorsichtig geschwenkt, damit sie vollständig in Lösung geht.

Verdauungspuffer

100	mM	NaCl
10	mM	Tris-HCl, pH 8
25	mM	EDTA, pH 8
0,5	%	SDS
0,1	mg/ml	Proteinase K (Stammlösung 10mg/ml)

2.2.4.3. DNase-Verdau

Um DNA-Kontaminationen der RNA-Präparationen vollständig zu beseitigen und somit falsch positiven Signalen vorzubeugen, wurde zuerst ein DNase-Verdau durchgeführt.

Ansatz, ad 25µl

1 µg	Gesamt RNA
5 µl	first-strand-Puffer 5x (50mM Tris, pH 8,3; 75mM KCl, 3mM MgCl ₂)
1 µl	DNaseI (10 U/µl)
x µl	ddH ₂ O auf 25µl auffüllen

Der Verdau wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluß daran wurde 2,5µl 25mM EDTA dazupipettiert und die DNaseI 10 Minuten bei 65°C inaktiviert.

2.2.4.4. Reverse Transkription (RT)-Reaktion

Der gesamte Ansatz aus dem DNase-Verdau wurde in die Reverse Transkription (RT) eingesetzt. Für die RT-Reaktion wurde oligo-dT30 als Primer und die *Reverse Transkriptase* des Moloney-Mäuseleukämievirus (MMLV-Superscript RT) gewählt.

Reaktionsansatz, ad 50µl

27,5	µl	DNase-Verdau-Mix
2,5	µl	oligo dT30 (110ng/µl)
5	µl	first-strand-Puffer 5x
5	µl	DTT (0,1 M)
2	µl	dNTP's (5 mM)
1	µl	RNasin
1	µl	MMLV Superscript RT (200 U/µl)
6	µl	ddH ₂ O
$\Sigma = 50\mu\text{l}$		

Zur Synthese des Erststrangs wurde der RT-Ansatz für 30min. bei 42°C inkubiert. Die *Reverse Transkriptase* wurde durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz sofort auf Eis gestellt. Die so entstandene cDNA wurde in die nun folgende PCR eingesetzt. Als Kontrolle für eine positive RT-Reaktion wurde eine PCR-Reaktion mit Primern durchgeführt, die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) erkennen. Hierzu wurden Primer verwendet, die eine Teilsequenz erkennen, die auf DNA-Ebene durch Introns unterbrochen ist. Nur bei erfolgreicher RT-Reaktion wird das typische GAPDH-Signal von 452 bp sichtbar.

2.2.4.5. PCR-Reaktion zur Erkennung der UGT 1A-Isoenzyme

In den nachfolgenden PCR-Reaktionen wurden jeweils 1/10 Vol. des RT-Produktes amplifiziert. Der Reaktionsansatz betrug 50µl.

Reaktionsansatz

4,0	μl	10x Puffer (20mM Tris-HCl, ph 8.4 ; 50mM KCl)
1,5	μl	MgCl ₂ (50mM)
2,0	μl	dNTP's (5mM)
1,0	μl	Primer 5' (20μM - 50μM)
1,0	μl	Primer 3' (20μM - 50μM)
5,0	μl	RT-Probe
0,5	μl	Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)
35	μl	ddH ₂ O
Σ =		50μl

Um eine hohe Reproduzierbarkeit und Sensitivität der Methode zu gewährleisten, wurde für jedes Primerpaar ein zusätzlicher Ansatz mit 2μg genomischer DNA angesetzt, die alle intakten Exons 1 enthielt. Bei einer erfolgreichen PCR reichte die Sensitivität aus, um aus der genomischen DNA die Einzelkopien der Exons1 herauf zu amplifizieren. Somit wurde die PCR mit jedem Primerpaar durch eine positive PCR-Kontrolle überprüft und falsch negative Ergebnisse ausgeschlossen.

In jedem PCR-Lauf, der im Robocycler durchgeführt wurde, befanden sich nicht nur die zu testenden Proben, sondern jeweils auch eine Positiv- und Negativ-Kontrolle jedes einzelnen Primerpaars. Zusätzlich wurde jede PCR-Reaktion zweifach kontrolliert. Das Programm sah wie folgt aus:

<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zyklen</u>	
3 min	94°C	1x	Denaturierung
1 min.	94°C	35x	Denaturierung
1 min.	55-66°C		Annealing
2 min.	72°C		Elongation
7 min.	72°C	1x	Zusätzliche Elongation

2.2.5. Northern Blot

Die zu untersuchende RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen in einem Formaldehyd-Agarose-Gel entsprechend ihres Molekulargewichts elektrophoretisch aufgetrennt, mit Hilfe der Blotting-Technik auf eine geeignete Trägermembran transferiert und dort immobilisiert. Nach Hybridisierung der Trägermembran mit radioaktiv markierter DNA, die der gesuchten RNA komplementär ist, kann die RNA durch Autoradiographie der Trägermembran sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe dieses Verfahrens läßt sich die Größe der RNA und auch ihre Menge bestimmen.

2.2.5.1. RNA-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der RNA wurde ein 1,2 %-iges Agarose/1x MOPS-Gel verwendet. Am Anschluß daran wurde das Gel in 1x MOPS-Laufpuffer bei 100-140 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Jeweils 30µg Gesamt-RNA wurden vor dem Auftragen in das Agarosegel mit 1/5 Vol. RNA-Ladepuffer versetzt und 10 Minuten bei 65°C inkubiert.

Um RNasen zu inaktivieren, wurde die Gelkammer und jedes weitere Zubehör vor Gebrauch, in 0,1M NaOH gelegt und dann gut mit ddH₂O abgespült.

10x MOPS-Puffer, pH 7,0; ad 1000ml

41,8 g	MOPS (0,2 M)
6,8 g	Natriumacetat (50 mM)
2 ml	0,5 M EDTA, pH 8 (0,01 M)

5x Ladepuffer, ad 10ml

16 µl	Bromphenolblau-Lsg.
80 µl	500 mM EDTA, pH 8
100 µl	EtBr (Stock 10mg/ml)
720 µl	37% Formaldehyd
2000 µl	100% Glycerol
3084 µl	Formamid
4000 µl	10x MOPS

2.2.5.2. SSC-Kapillar-Blot

Mit Hilfe eines Kapillarblots wurde die RNA über Nacht auf Hybond N+Nylonmembran (Amersham) transferiert. Die Hybond N+ Nylonmembran wurde kurz in ddH₂O (Fresenius) und dann in 10x SSC-Puffer geschwenkt. Der Kapillarblot wurde wie folgt durchgeführt: Über eine mit 10x SSC-Puffer gefüllte Plastikschielle wurde eine Glasscheibe gelegt. Ein Streifen Whatmanpapier wurde auf identische Breite des Gels zugeschnitten, mit 10x SSC angefeuchtet und so über die Glasscheibe gelegt, daß beide Enden in den Puffer tauchten. Auf diesen Streifen wurde nun das Gel gelegt und luftblasenfrei mit der Nylonmembran bedeckt. Die Vermeidung von Luftblasen war unbedingt notwendig, da sonst an dieser Stelle kein Transfer der RNA stattfand. Drei Lagen mit Puffer durchtränkten Whatmanpapiers wurden auf die Nylonmembran aufgelegt, der Blot mit Zellstofftüchern bedeckt und über Nacht mit einem Gewicht von etwa 1 Kilogramm beschwert. Am nächsten Morgen konnte der Filter vorsichtig abgenommen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet werden. Zur Fixierung der RNA wurde die Membran etwa 1 Minute lang in einem UV-Stratalinker (Stratagene) bestrahlt, kurz in 2x SSC-Puffer geschwenkt und für die nun folgende Hybridisierung eingesetzt.

2.2.5.3. Markierung von DNA-Sonden mit [α -³²P] dCTP

(Feinberg und Vogelstein, 1983 und 1984)

Die radioaktive Markierung der DNA-Sonde erfolgte mit dem Rediprime-DNA-Labeling-System der Firma Amersham. Hexamere Oligonukleotide unterschiedlicher, zufälliger Nukleotidsequenzen („Random Primer“) wurden zur DNA hinzugegeben, die sich an die komplementären Sequenzen denaturierter Einzelstrang-DNA anlagern. Die Polymerase I (Klenow-Fragment) füllt die Bereiche zwischen den Random-Primern mit Nukleotiden auf. Bei der Reaktion wurde radioaktiv markiertes [α -³²P] dCTP verwendet. Es entstehen DNA-Doppelstränge.

25-40ng cDNA wurden in 45 μ l H₂O bidest. aufgenommen und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde diese Lösung in das Röhrchen mit dem Labelling-Mix pipettiert und mit 5 μ l [α -³²P] dCTP versetzt. Nach der einstündigen Inkubation bei 37°C wurde die DNA-Sonde über eine Nick-Spin-Columns (Pharmacia) aufgereinigt, und es folgte eine Bestimmung der spezifischen Aktivität im β -Counter. Das Gesamtvolumen zur Hybridisierung

betrug 5ml und für den Northern Blot wurden jeweils 2×10^6 cpm/ml zum Hybridisieren eingesetzt.

2.2.5.4. Hybridisierung eines Northern Blots

Für die Hybridisierung stand ein Hybridisierungssofen (Appligene) mit sich drehenden Hybridisierungsröhren zur Verfügung. Diese Vorrichtung bot den Vorteil, daß während der Hybridisierung nur wenig Hybridisierungspuffer gebraucht wurde. Zur Prähybridisierung wurde die Nylonmembran in eine Hybridisierungsröhre überführt und bei 65°C mit 5ml Churchlösung ca.1 Stunde vorhybridisiert. Die unter 2.2.5.3. hergestellte radioaktiv markierte Sonde wurde dann denaturiert in die Hybridisierungsröhre dazugegeben und nach Church et al., 1984 über Nacht bei 65°C hybridisiert. Die Blots wurden fünfmal bei 65°C mit Church-Waschlösung für jeweils 1 Stunde gewaschen und in Plastikfolie (Jürgens) eingeschweißt. Die Detektion und Quantifizierung der Signale wurde mit einem Fuji Bas 1000 Reader (Raytest) vorgenommen.

Church-Lösung

500 mM	NaPO ₄ , pH 7,2
1 mM	EDTA, pH 8
7 %	SDS-Lsg.

Church-Waschlösung

500 mM	NaPO ₄ , pH 7,2
20 %	SDS-Lsg.

10x SSC-Puffer, pH 7,0

1,5 M	NaCl
0,15 M	Natriumcitrat

2.2.5.5. Entfernung („strippen“) der radioaktiven Probe von der Membran

Um auf einem Filter mehrere Hybridisierungen durchführen zu können, mußte zuvor die radioaktive, gebundene DNA vom Filter entfernt werden. Hierzu wurde der Filter dreimal für 20 Minuten in heißer 0,1 %-iger SDS-Lösung gewaschen. Ob nun die radioaktive DNA vollständig entfernt war und die Bindungsstellen wieder frei für eine neue Hybridisierung waren,

konnte mit Hilfe des Handdetektors für beta-Strahlung (Berthold) festgestellt werden. Als zusätzliche Kontrolle diente eine Exposition am Phosphoimager über Nacht.

2.2.5.6. Auswahl der Sonden zur Erkennung der UGT 1A-Proteine

Die Sonden für die Northern Blots wurden ebenfalls in den hochvariablen Regionen des UGT1A-Genkomplexes gelegt, um Kreuzreaktivität zu vermeiden. Dabei wurde insbesondere darauf geachtet, daß die Sequenzhomologie zum nächsten Vertreter des UGT 1A-Isoenzym auf Nukleotidebene stets geringer als 60% war.

Zur Herstellung isoenzym-spezifischer Sonden für die Northern Blots wurden aus genomischer Rattenleber-DNA mit Hilfe der PCR spezifische DNA-Sequenzabschnitte amplifiziert. Die entsprechenden Primer mit den dazugehörigen Annealingtemperaturen sind in **Tabelle 2** aufgeführt. Die PCR-Produkte wurden direkt mit dem TA-Cloning-Kit (Invitrogen) kloniert und die Identität des Inserts wurde durch Sequenzanalyse überprüft. Anschließend wurde eine DNA-Maxi-Präparation (s. 2.2.1.2.1.) durchgeführt, um immer ausreichend Material zur Verfügung zu haben.

Table 2: Sondenherstellung zur Erkennung der UGT 1A-Proteine im Northern Blot

UGT	Sequenz	Annealing	Transkriptgröße
1A1-7F 1A1-153R	5`tggtgtgccggagctcatgttcg 3` 5`ctgctgaataactccgagcatactc 3`	59°C	146 bp
1A2-255F 1A2-360R	5`ggaagaatatcagcgggaaatactgggc 3` 5`gagctgcacaagaatttgcgtagagatcg 3`	55°C	105 bp
1A3-260F 1A3-419R	5`ggcaccacttgetgggccaccttc 3` 5`gagttcaggctctggatcagagctg 3`	62°C	159 bp
1A5-F286 1A5-R412	5`gtggtctttgaaacaggcaactatgtg 3` 5`gatgctggagcagggaccattgtg 3`	64°C	126 bp
1A6-F141 1A6-R338	5`cctcagtgaacgcggacacgac 3` 5`tcctgtactctcttagaggagcca 3`	62°C	197 bp

1A7-186F	5`cagttggcagctgggaaaacca 3`	63°C	169 bp
1A7-354R	5`gaagaaaccctgggcagggcta 3`		
1A8-191F	5`ggcacatgggaaagtcgttga 3`	56°C	153 bp
1A8-3344R	5`ccttgcctgaatgcttcag 3`		
1A9-F487	5`cttccatcagtcatttagcaaaa 3`	57°C	176 bp
1A9-R662	5`gagcaaaatgcacgttctcaaaa 3`		
C-Terminus-1427F	5`cgcccacgacctcactggtag 3`	58°C	184 bp
C-Terminus-1611R	5`cttctcctcacttctgccacttc 3`		

2.2.5.7. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase)

Für die aufgetragene Menge an RNA wurde als weiteres Kontrollgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, ein Enzym der Glykolyse, verwendet (Fort et al., 1985). Da die GAPDH-Expression in verschiedenen Organen nicht konstant ist, wurde bei einigen Northern Blots zum RNA-Abgleich die 28S-Banden der RNA-Gel verwendet. Die RNA-Gele wurden mit einem Gel-Doc 1000 Video Gel Dokumentationssystem (Biorad) quantifiziert.

2.2.6. Herstellung monospezifischer Antikörper

2.2.6.1. Reinigung des C-Terminus aus „inclusion bodies“

Zur Herstellung großer Mengen an humanen UGT1A1-Protein wurden DH5-FIQ-Zellen verwendet. Diese waren zuvor mit dem Plasmid pQE30-UGT1-C transfiziert worden, einem induzierbaren Induktionsvektor. Das pQE30-UGT1-C Plasmid enthält eine cDNA, die für den C-Terminus des humanen UGT1A1 kodiert. Die Expression dieser cDNA kann durch IPTG induziert werden und führt zur Bildung des C-Terminus des UGT1A1 als Hauptprotein. Eukaryontische rekombinante Proteine, die in E-coli exprimiert werden, neigen durch eine hohe Expressionsrate oft zur Bildung unlöslicher, nicht kristalliner Aggregate, die im Cytoplasma vorliegen und nicht von einer Membran umgeben sind. Diese Einschlußkörperchen werden zum Beispiel vom humanen Insulin oder von rHu-IFN- γ (Thornton et al., 1983) gebildet. Die Reinigung von rekombinanten Proteinen aus diesen „Inclusion bodies“ erfordert die Denatu-

rierung des in ihnen gebundenen Proteins. Zur Denaturierung werden chaotrope Reagenzien wie Harnstoff oder Guanidiumchlorid eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde der C-Terminus (C5), der für alle UGT1A-Proteine konstant ist, über Inclusion bodies aufgereinigt. Die präparative Proteinaufreinigung erfolgte aus einer 1 l LB-Ampicillin-Kultur. Nach der Inokulation im Verhältnis 1/100 mit einer frischen Übernachtskultur wurde 3 Stunden bei 37°C im Schüttler bei 225Upm inkubiert. Die OD, gemessen bei 600nm, erreichte einen Wert von 0,6-0,7, was einer Kultur in der späten log-Phase des Wachstums entspricht. Anschließend wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1mM IPTG induziert. Nach einer weiteren Induktion von 3,5 Stunden wurden die Bakterien abzentrifugiert (25min. 4000rpm bei 4°C). Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in 20ml PBS gewaschen. Das Pellet wurde nun in kaltem 8 M Harnstoff-Puffer resuspendiert und in einem Eisbad einer Ultraschall-Lyse unterzogen (Schallgerät Labsonic 2000; Braun). Beschallt wurde in 6 Intervallen von jeweils 20s., die durch 20s. Pause unterbrochen waren. Die Schalleistung betrug alternierend 90 und 240 Watt. Die Proben wurden erneut abzentrifugiert (15min. 10000rpm bei 4°C) und der Überstand verworfen. Die im Pellet befindlichen Inclusion bodies wurden bei -20°C gelagert.

Harnstoff-Puffer, pH 7,0

8	M	Harnstoff
50	mM	Natriumphosphat

2.2.6.1.1. Reinigung des Proteins durch präparative Gelelektrophorese

Die Protein-Elution wurde in dem Elektro-Eluter Modell 422 der Firma Biorad durchgeführt. Das Pellet mit den Inclusion bodies (s.2.2.6.1.) wurde in Probenpuffer (s.2.2.2.1.) aufgenommen und in einem 11 %-iges SDS-Gel aufgetrennt. Danach wurde das Gel mit Sypro-Orange gefärbt (s.2.2.2.3.2.) und die 30 kD Bande des C-Terminus des UGT1A1 unter UV-Licht herausgeschnitten. Die herausgeschnittenen Gelfragmente wurden in Elutionsglasröhrchen mit Fritte und Membranfiltern überführt. Die Membranfilter waren zuvor 1 Stunde lang bei 60°C in Elutionspuffer eingeweicht worden. Das rekombinante Protein wurde bei 8-10 mA pro Röhrchen über Nacht eluiert. Das Eluat wurde bei -20°C gelagert.

Elutionspuffer

25	mM	Tris base
192	mM	Glycin
0,1	%	SDS

2.2.6.1.2. Ultrafiltration mit Amicon-Zentrifugenröhrchen

Um das Volumen der Probe nach der Elution weiter zu verkleinern, wurde eine Ultrafiltration durchgeführt. Eingesetzt wurden Centricon-10 Zentrifugenröhrchen (Amicon) mit einer Ausschlußgrenze von einem Molekulargewicht von 10 kD. Zentrifugiert wurde bei 3000g. Das Probenauftragsvolumen betrug maximal 2ml. Die Probenkonzentration wurde maximal um den Faktor 10 erhöht, wodurch die Proben konzentriert genug zur Immunisierung waren.

2.2.6.2. Herstellung von Peptidantikörpern

Sequenzen von 13 Aminosäuren Länge aus den variablen Bereichen des UGT1A-Genkomplexes wurden zur Herstellung monospezifischer Antikörper ausgewählt und durch die Firma Nano Tools synthetisiert. Zur Immunisierung von Kaninchen wurden die Peptide mit einem zusätzlichen Cystein versehen und anhand dieses Cysteins an Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) gekoppelt. Als Reagenz zur Kopplung der Peptide an KLH diente Maleinimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimid.

2.2.7. Immunisierung von Kaninchen

Für jeden monospezifischen Antikörper wurden jeweils zwei Kaninchen (Chinchilla White) nach dem folgenden Injektionsschema immunisiert. Alle Injektionen erfolgten subcutan, und vor Beginn der Immunisierung wurde allen Tieren 5ml Nullserum entnommen.

Tag	0	14	28	38	56	66	80
Injektion	1.	2.	3.		4.		
Blutentnahme		2ml		2 ml		2ml	Entblutet

1. Injektion: Eluat (1mg C5-Protein) + Complete Freund'sches Adjuvants (FA)
je 250µg Peptid an KLH gekoppelt + Complete FA

2.- 4. Injektion: Eluat (1mg C5-Protein) + Incomplete FA
je 250µg Peptid an KLH gekoppelt + Incomplete FA

In regelmäßigen Abständen wurden die Antikörpertiter im Western-Blot getestet. Die Tiere wurden am 80. Tag, durch eine in Narkose durchgeführte Herzpunktion, vollständig entblutet. Das Blut wurde anschließend abzentrifugiert und das Serum bei -20°C gelagert.

2.2.8. Aktivitätstest

Die Substrate wurden in Methanol oder DMSO gelöst und in einer Endkonzentration von 100µM in die Assays eingesetzt. Die enzymatische Aktivität wurde mit mikrosomalem Protein gemessen. Die Testansätze enthielten ¹⁴C-markierte UDP-Glucuronsäure, das jeweilige Substrat sowie Phosphatidylcholin. Die Reaktion wurde 60min. bei 37°C durchgeführt, und das Protein durch Zugabe von Ethanol präzipitiert. Die präzipitierten Bestandteile wurden durch eine Zentrifugation entfernt. Die Glukuronidhaltigen Überstände wurden lyophilisiert, als methanolische Lösungen auf Kieselgelplatten aufgetragen und in einer Dünnschichtchromatographie mit einem n-Butanol/Aceton/Essigsäure/Wasser-Gemisch (35:35:20:20%) aufgetrennt. Die Detektion und Quantifizierung der ¹⁴C-markierten Glucuronide erfolgt mittels eines Phosphoimagers.

3.1. Charakterisierung des Expressionsmusters der UGT1A-Isoformen mittels RT-PCR

Die Expression der neun verschiedenen Exon1 der Ratte ist gewebsspezifisch reguliert. Bisherige Untersuchungen der UDP-Glukuronosyltransferasen wurden hauptsächlich in der Leber, dem Hauptentgiftungsorgan vorgenommen. Nur wenige Arbeiten beschäftigten sich mit dem Darm, dessen Aufgabe auch darin besteht, schädliche Substanzen zu eliminieren. Bei diesen Untersuchungen wurde jedoch meist keine Unterscheidung innerhalb der einzelnen Darmabschnitte vorgenommen, sondern häufig der gesamte Darm zur Analyse eingesetzt.

Aus diesem Grund, wurde das Expressionsmuster der UGT1A-Isoenzyme in den einzelnen Darmabschnitten auf RNA-Ebene genauer charakterisiert und eine RT-PCR etabliert. Dazu wurde die Methode so eingestellt, daß sie mit der höchst möglichen Sensitivität die exprimierten UGT1A-Isoenzyme nicht nur unterscheidet, sondern auch vollständig erfaßt. Wie unter **2.2.4.1.** beschrieben, wurde zur Auswahl der Primer ein Alignment der DNA-Sequenzen der verschiedenen Exon1 des UGT1A-Genkomplexes durchgeführt. Die Primer wurden aus den hypervariablen Regionen der UGT1A-Gene ausgewählt. Aufgrund der Sequenzhomologie, die zum nächst verwandten UGT1A-Gen auf Nukleotidebene stets kleiner als 70% war, konnten die UGT1A-Isoenzyme in den einzelnen Darmabschnitten eindeutig erkannt und unterschieden werden.

Um zu zeigen, daß alle neun ausgewählten Primerpaare auch ein positives Signal ergeben, wurde als Template 2µg genomische DNA aus der Leber der Ratte in die PCR eingesetzt. Die genomische DNA enthält alle Exon1 der UGT1A-Gene als Einzelkopie. Somit stellt die genomische DNA ein ideales Template zum Nachweis der Sensitivität der PCR dar. **Abbildung 3** zeigt die neun Positivkontrollen. Die PCR war sensitiv genug, um die Einzelkopien der Exon1 zu isolieren.

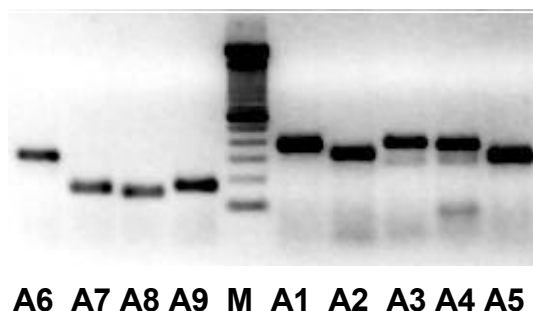


Abb.3: Dargestellt ist eine PCR mit den neun Positivkontrollen. Als Template wurden 2µg genomische DNA, isoliert aus der Leber der Ratte, eingesetzt. Als Marker wurde eine 100bp-Leiter verwendet.

Nun wurde die RNA aus Leber, Niere, Magen und den verschiedenen Darmabschnitten (Ösophagus, Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Colon und Rectum) isoliert und mittels RT-PCR vergleichend untersucht. Bei jeder RNA-Extraktion können Kontaminationen, zum Beispiel durch genomische DNA auftreten, die dann wiederum in der PCR zu falsch positiven Signalen führen. Um daher falsch positive Ergebnisse auszuschließen, wurden zu Beginn alle verwendeten RNA-Proben einem DNase-Verdau unterzogen. Im Anschluß daran wurde eine reverse Transkription, jedoch ohne die Reverse Transkriptase, mit anschließender PCR wie unter 2.2.4.5. beschrieben durchgeführt. Nach Auftrag in ein 2 %-iges ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel, zeigte sich durch die Abwesenheit kontaminierender DNA ein komplett negatives Ergebnis (s. Abb.4).

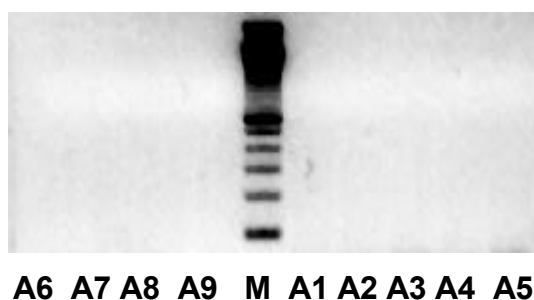


Abb.4: Dargestellt sind die neun Negativkontrollen. Alle RNA-Proben wurden einem DNase-Verdau unterzogen. Die Reverse Transkription wurde ohne die Reverse Transkriptase durchgeführt und anschließend in die PCR eingesetzt. Als Marker diente eine 100bp-Leiter.

Für jede zu testende RNA wurde ein DNase-Verdau und eine Reverse Transkription (RT) mit und ohne Reverse Transkriptase und anschließender PCR durchgeführt. Da die verwendete PCR-Maschine (Robocycler) über einen Temperaturgradienten verfügt, konnten alle neun Primerpaare trotz unterschiedlicher Annealing Temperaturen parallel in einem Lauf getestet werden. Zusätzlich lief zu jeder RNA-Probe eine PCR mit genomischer DNA als Positiv-Kontrolle.

Als Kontrolle für die RT-Reaktion wurden Primer zur Detektion von GAPDH eingesetzt. Die GAPDH-Primer erkennen eine Teilsequenz, die auf DNA-Ebene durch Introns unterbrochen ist, und nur bei einer erfolgreichen RT-Reaktion ein Signal von 452 bp geben. Alle RT-PCR's wurden als drei unabhängige Versuche durchgeführt.

In der Leber wurde ein komplexes Muster in der UGT1A-Expression festgestellt (s. **Abb.5**) Die Bilirubintransferase UGT1A1, die Paranitrophenoltransferase UGT1A6 und UGT1A7 zeigten sehr starke Signale. Etwas schwächer wurde das UGT1A5 exprimiert und als sehr schwache Banden konnten UGT1A2 und UGT1A8 detektiert werden. Überraschenderweise konnte außerdem die mRNA des Pseudogens UGT1A9 in der RT-PCR nachgewiesen werden.

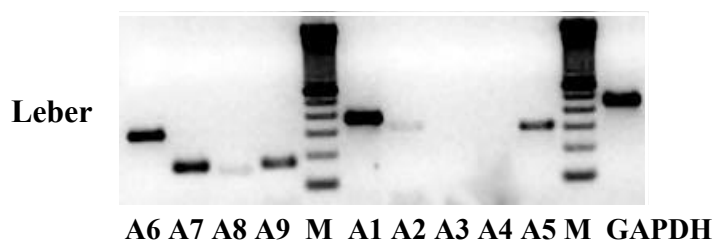


Abb.5: Dargestellt ist das UGT1A-Expressionsmuster der Leber anhand einer RT-PCR. Als Größenmarker diente eine 100bp-Leiter.

Das UGT1A-Expressionsmuster der Niere stellte im Gegensatz zur Leber eine geringere Komplexität dar. Zwar wurden auch hier starke Signale bei UGT1A1, UGT1A6 und UGT1A7 sowie die mRNA des Pseudogen UGT1A9 gefunden, doch im Vergleich zur Leber fehlte die Expression von UGT1A5 und UGT1A8.

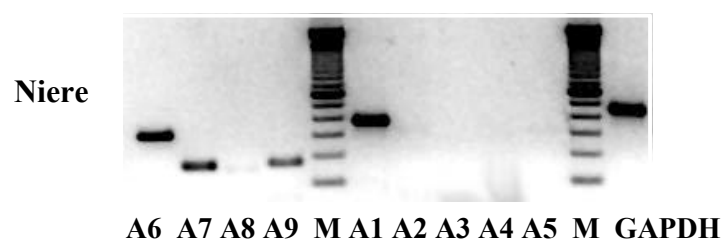


Abb.6: Dargestellt ist das UGT1A-Expressionsmuster der Niere anhand einer RT-PCR. Als Marker wurde eine 100bp-Leiter verwendet.

Bei der Betrachtung aller Abschnitte des Gastrointestinaltraktes (s. **Abb.7**) der Ratte wurden drei Hauptvertreter gefunden. Es handelte sich hierbei um UGT1A1, UGT1A6 und UGT1A7, die selben Vertreter, die auch in den Organen Leber und Niere exprimiert wurden. Zusätzlich

konnte jedoch im Gastrointestinaltrakt auch das UGT1A2 und UGT1A3 nachgewiesen werden. UGT1A2 war im Oesophagus nicht exprimiert, trat erstmals im Magen dazu und zeichnete sich im gesamten Dünndarm durch ein starkes Signal aus. Nach distal (ab Caecum) wurde das Signal schwächer. UGT1A3 war nur im Duodenum und Jejunum exprimiert.

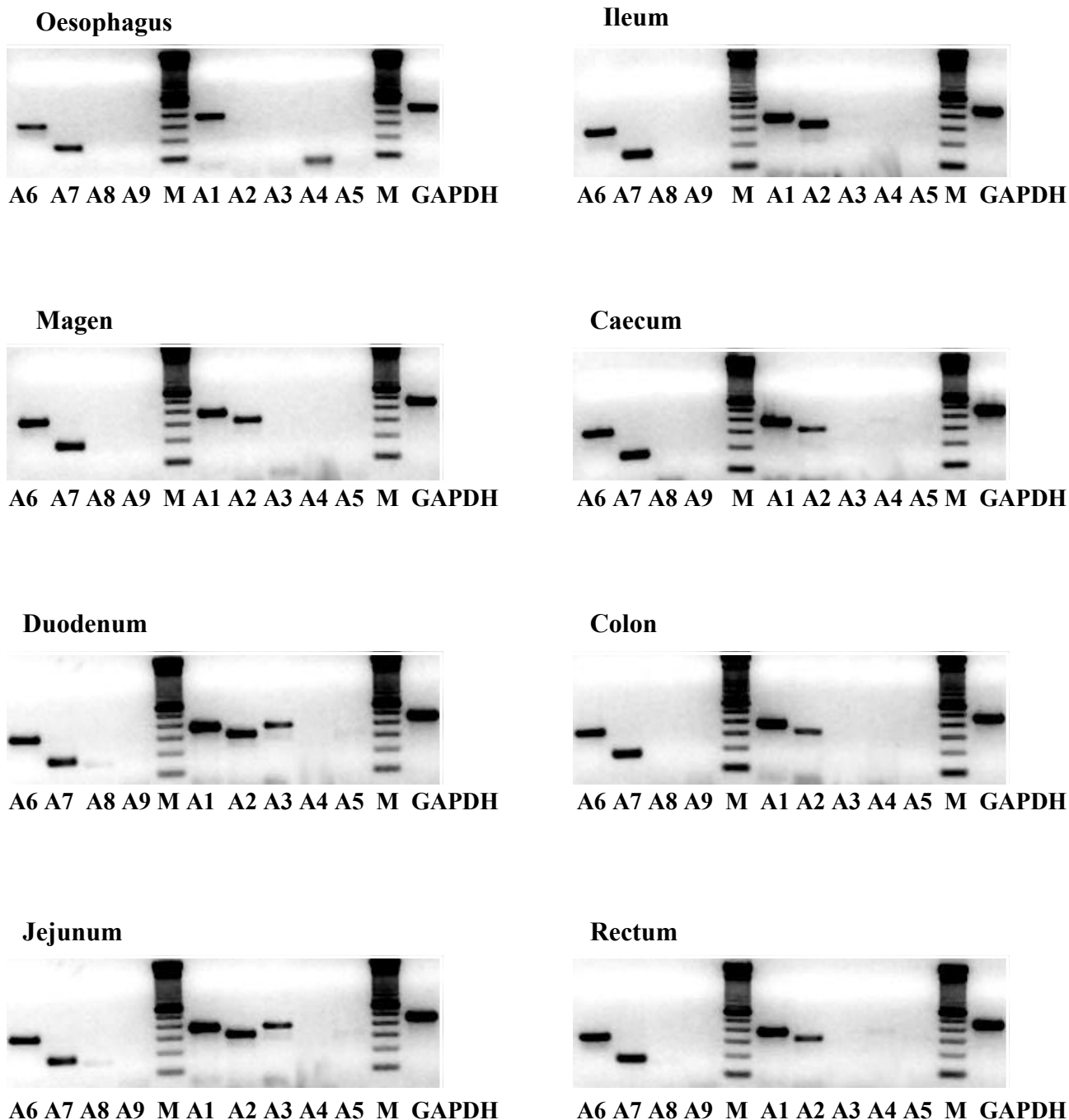


Abb.7: Dargestellt ist das mRNA-Expressionsmuster der neun UGT1A-Isoenzyme aller gastrointestinalen Abschnitte unter Verwendung einer RT-PCR. Als Größenmarker diente eine 100bp-Leiter.

Es konnte gezeigt werden, daß die gastrointestinale Barriere über eine komplexe Ausstattung an UGT1A-Isoenzyme auf RNA-Ebene verfügt, die zur Entgiftung eingesetzt werden können. Die Frage nach der Expressionshöhe wurde anhand von Northern Blot-Analysen weiter untersucht.

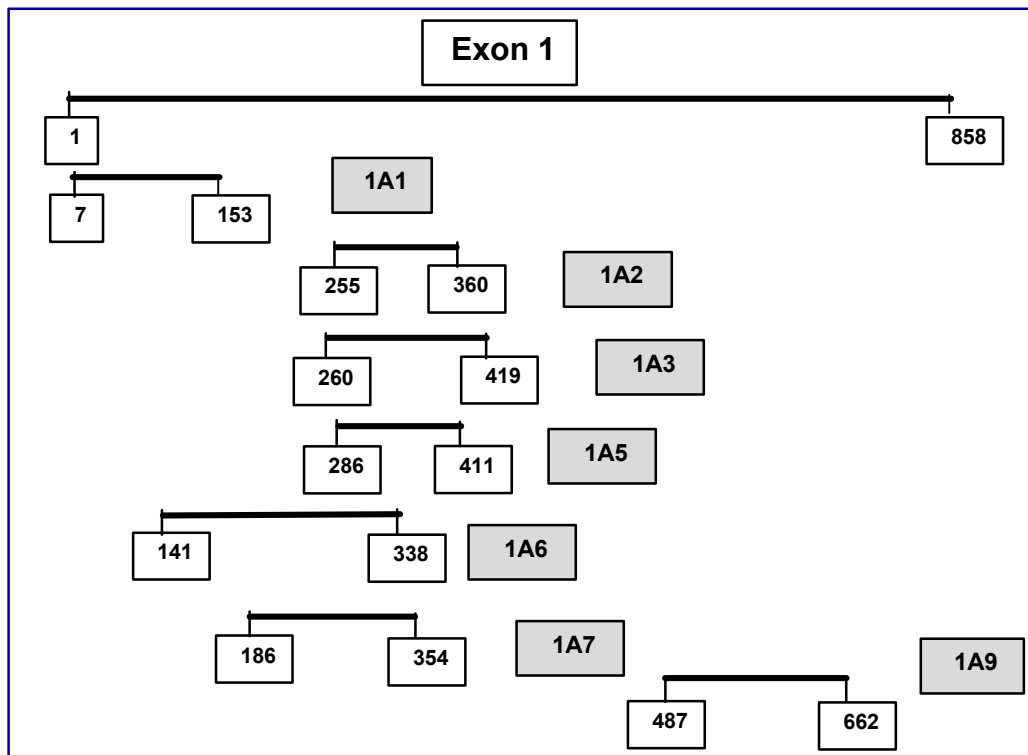
3.2. Quantifizierung des Expressionsmusters der UGT1A-Isoenzyme

Das bisher gefundene Expressionsmuster der Glukuronosyltransferasen (UGT's) wurde mittels RT-PCR erfaßt. Da alle PCR's mit 35 Zyklen durchgeführt wurden, befand sich die Produktmenge der meisten UGT's nicht in der exponentiellen- sondern immer in der Sättigungsphase. Somit konnte keine quantitative Aussage getroffen werden. Um die Expressionshöhe der einzelnen UGT1A-Isoenzyme zu quantifizieren, wurden Northern Blot Analysen durchgeführt.

Für alle UGT1A-Isoenzyme, die in der RT-PCR ein positives Signal ergaben, wurden, wie unter 2.2.5.6. beschrieben, DNA-Sonden für die Northern Blots hergestellt. Um Kreuzreaktivität zu vermeiden, wurden die isoenzym-spezifischen Sonden, ähnlich wie bei der PCR, in den hochvariablen Regionen der Exon1 der UGT1A-Gene gelegt. Außerdem wurde darauf geachtet, daß die Sonden in etwa alle die gleiche Länge besaßen. Dabei war die Sequenzhomologie zum nächsten Vertreter des UGT1A-Isoenzym auf Nukleotidebene stets geringer als 60%. Zusätzlich wurde eine DNA-Sonde hergestellt, die mit einer Länge von 184bp den konstanten C-Terminus erkennt und somit in der Lage war, alle UGT1A-Transkripte zu detektieren.

Jede einzelne Sonde wurde durch Restriktionsverdau und Sequenz-Analyse komplett auf ihre Richtigkeit hin überprüft. Alle Sonden standen nun als Plasmid-DNA zur Verfügung und durch eine PCR mit den jeweiligen spezifischen Primern, die auch zum Klonieren verwendet wurden, konnten die DNA-Sonden jederzeit und in ausreichender Menge amplifiziert werden. Nach einer Aufreinigung und einer quantitativen Abschätzung im Gel, mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers, konnten die DNA-Sonden zur Hybridisierung im Northern Blot eingesetzt werden.

Die Lage der Sonden ist in **Abbildung 8** dargestellt.

**Abb. 8:**

In Abbildung 8 ist die Lage der einzelnen Sonden schematisch dargestellt. Die Zahlen geben die Nukleotidposition der kodierenden RNA-Sequenz des jeweiligen Isoenzym an. Die C-terminale Sonde (hier im Schema nicht dargestellt) liegt komplett im C-Terminus des Proteins mit der Position 1427-1611.

Zur Markierung der spezifischen DNA-Sonden wurde [α - 32 P] dCTP mit einer Aktivität von 6000 Ci/mmol eingesetzt. Dies entspricht der doppelten Menge an [α - 32 P] dCTP, die normalerweise standardmäßig verwendet wird. Diese höhere spezifische Aktivität der Sonde führte zu einer Signalverstärkung.

In **Abbildung 9 bis 14** sind Northern Blots mit den Expressionsmustern von UGT1A1, UGT1A2, UGT1A3, UGT1A6, UGT1A7 und dem C-Terminus dargestellt. Da die Expressionshöhe von GAPDH ebenso wie die Expressionshöhe von β -Actin zwischen den verschiedenen Geweben stark variiert, wurde zum Abgleich der Blots die RNA-Menge der 28S Banden der RNA-Gele verwendet. Die RNA-Gele wurden mit einem Gel-Doc 1000 Video Gel Dokumentationssystem (Biorad) quantifiziert und sind ebenfalls in **Abbildung 9-14** mit dargestellt.

Unter Verwendung des Phosphoimagers wurden die Signale der Northern Blots quantifiziert. In der Grafik neben den Northern Blots sind die quantifizierten Signale prozentual dargestellt.

3.2.1. Expression der UGT1A-Isoenzyme

Um eine Vorstellung von der Gesamtexpression aller UGT1A-Isoenzyme im Gastrointestinaltrakt zu erhalten, wurde ein Northern Blot mit dem C-Terminus als Sonde angefertigt. Überraschend fiel zuerst auf, daß die UGT1A-Isoenzyme in den proximalen Abschnitten des Dünndarms und des Dickdarms genauso hoch exprimiert waren wie in der Leber (**s. Abb.9**). Sowohl im Dünndarm- als auch im Dickdarm fand eine Abnahme der UGT1A-Isoenzyme von proximal nach distal statt. Die Abnahme der Expression verlief im Dünndarm sowie im Dickdarm in Form eines Gradienten. Im Oesophagus waren die UGT's nur schwach exprimiert, und auch die Gesamtmenge der UGT's im Magen stellte sich ebenfalls gering dar. Erstaunlicherweise enthielt auch die Niere nur wenig UGT1A-Transkripte.

C-Terminus :

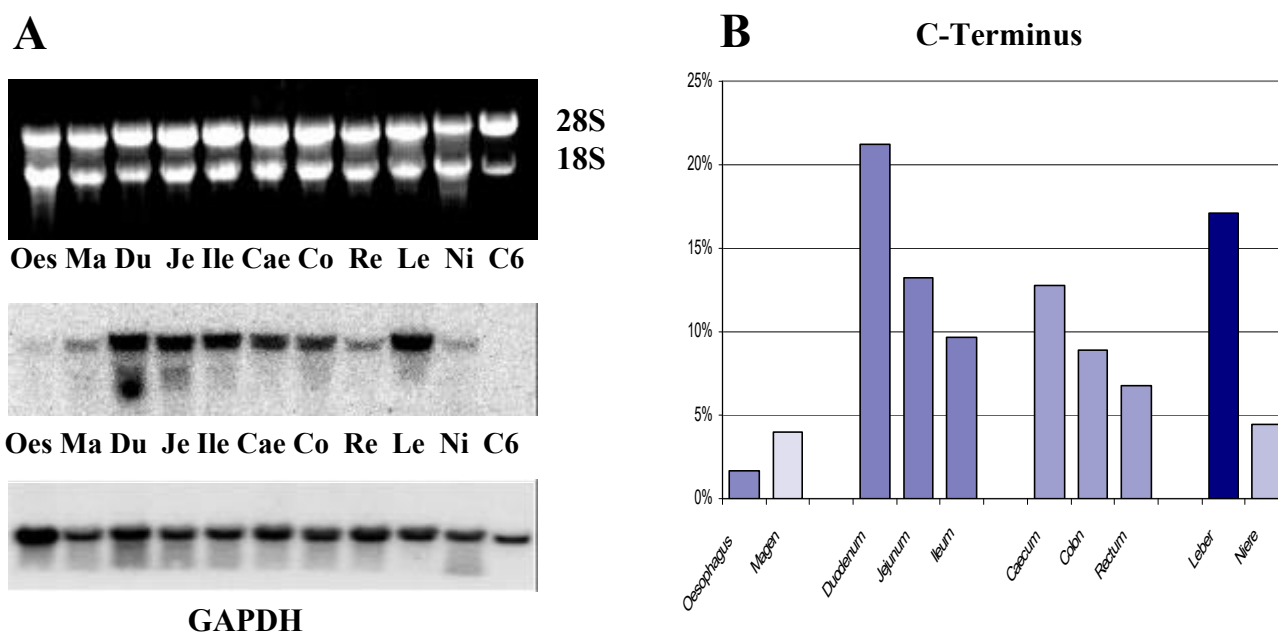


Abb. 9:

Figur A zeigt oben das RNA-Gel, das zur Standardisierung der Blots auf gleiche RNA-Menge diente. Pro Organ wurden 30µg Total-RNA aufgetragen. C6 steht für die RNA der C6-BU-1 Zelllinie (Gehirntumorzelllinie der Ratte), die keine UGT's der Familie1 exprimiert und als Negativkontrolle verwendet wurde. Die mittlere Memb-

ran wurde mit der C-terminalen- und die untere Membranen mit einer GAPDH-cDNA-Sonde hybridisiert. In Figur B sind die Signale der einzelnen Organe prozentual zur Summe aller Signale nach RNA-Abgleich dargestellt. **Oes** - Oesophagus, **Ma** - Magen, **Du** - Duodenum, **Je** - Jejunum, **Ile** - Ileum, **Cae** - Caecum, **Co** - Colon, **Re** - Rectum, **Le** - Leber, **Ni** - Niere.

3.2.2. Expression des UGT1A1

Die Expression des UGT1A1 zeigte ein ähnliches Muster wie es bereits für die gesamte UGT Familie1 beschrieben wurde (s. **Abb.10**). Auch hier bildeten sich im Dünn- und Dickdarm Gradienten, die von proximal nach distal abfielen. Eine Ausnahme zeigte die Leber, wo die Expression am höchsten war. Im Oesophagus, Magen, Rectum und Niere war die mRNA-Expression ebenfalls arm an UGT1A1.

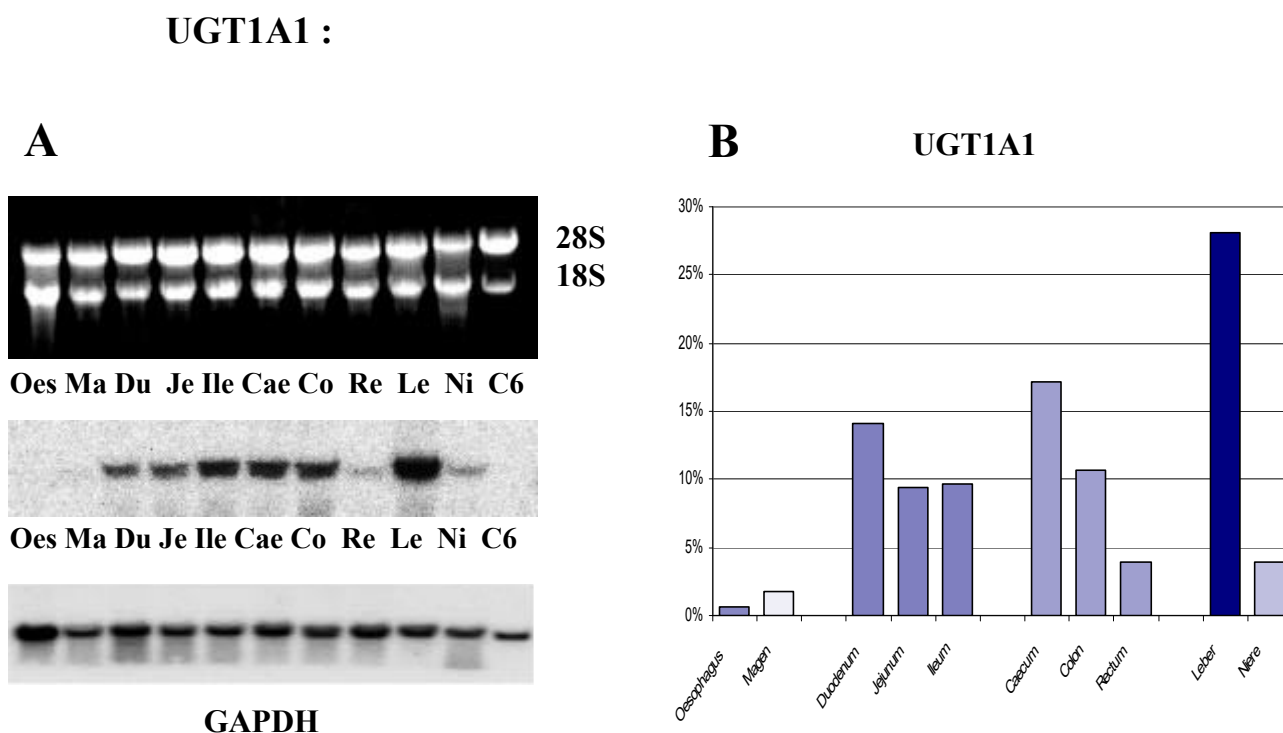


Abb. 10:

Figur A zeigt oben das RNA-Gel, das zur Standardisierung der Blots auf gleiche RNA-Menge diente. Pro Organ wurden 30µg Total-RNA aufgetragen. C6 steht für die RNA der C6-BU-1 Zelllinie (Gehirntumorzelllinie der Ratte), die keine UGT's der Familie1 exprimiert und als Negativkontrolle verwendet wurde. Die mittlere Membran wurde mit der UGT1A1- und die untere Membranen mit einer GAPDH-cDNA-Sonde hybridisiert. In Figur B sind die Signale der einzelnen Organe prozentual zur Summe aller Signale nach RNA-Abgleich dargestellt. **Oes** - Oesophagus, **Ma** - Magen, **Du** - Duodenum, **Je** - Jejunum, **Ile** - Ileum, **Cae** - Caecum, **Co** - Colon, **Re** - Rectum, **Le** - Leber, **Ni** - Niere.

3.2.3. Expression des UGT1A2

Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten eine gewebsspezifische Expression des UGT1A2. Kein Signal im Oesophagus und eine sehr schwache Expression in Leber und Niere standen einer starken Expression im Dünndarm, die ab dem Caecum wieder schwächer wurde, gegenüber. Bei den Northern Blot-Analysen war UGT1A2 jedoch nur im Magen und Dünndarm detektierbar. In allen anderen Organen lag die Expression unter der Detektionsgrenze (**s. Abb.11**). Im Dünndarm bildete sich deutlich ein Gradient, wobei die mRNA-Expression vom Duodenum zum Ileum hin deutlich geringer wurde.

UGT1A2 :

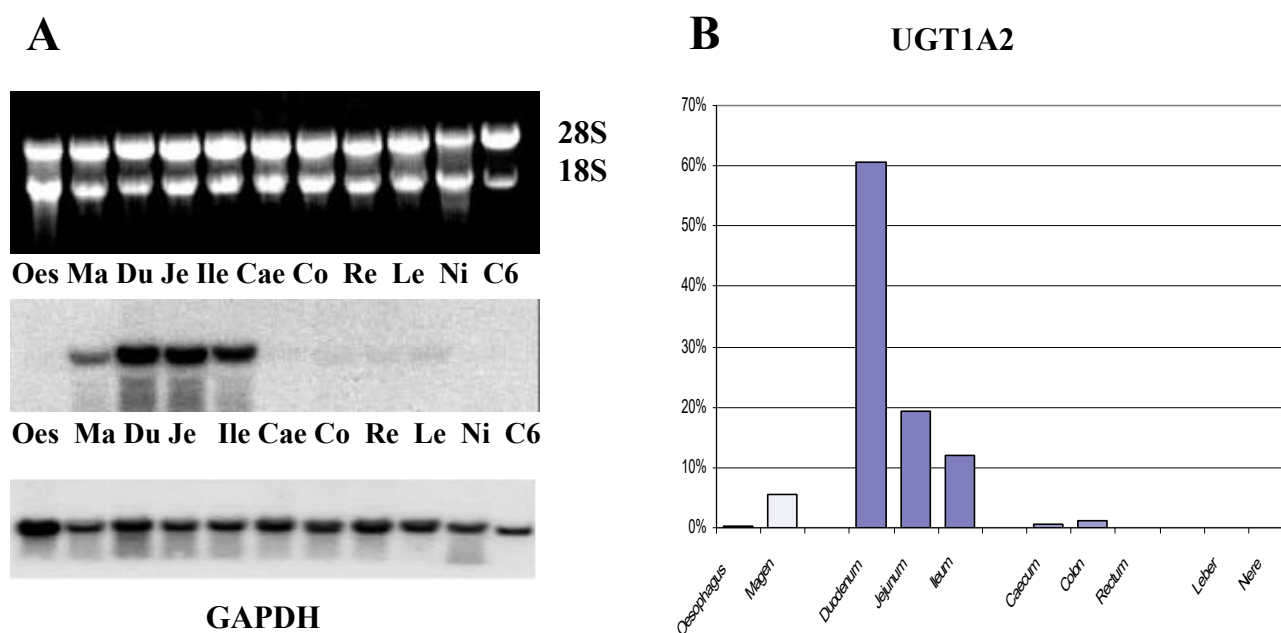


Abb. 11:

Figur A zeigt oben das RNA-Gel, das zur Standardisierung der Blots auf gleiche RNA-Menge diente. Pro Organ wurden 30µg Total-RNA aufgetragen. C6 steht für die RNA der C6-BU-1 Zelllinie (Gehirntumorzelllinie der Ratte), die keine UGT's der Familie1 exprimiert und als Negativkontrolle verwendet wurde. Die mittlere Membran wurde mit der UGT1A2- und die untere Membranen mit einer GAPDH-cDNA-Sonde hybridisiert. In Figur B sind die Signale der einzelnen Organe prozentual zur Summe aller Signale nach RNA-Abgleich dargestellt. Oes - Oesophagus, Ma - Magen, Du - Duodenum, Je - Jejunum, Ile - Ileum, Cae - Caecum, Co - Colon, Re - Rectum, Le - Leber, Ni - Niere.

3.2.4. Expression des UGT1A3

Die mRNA des UGT1A3 war in der RT-PCR nur im Duodenum und Jejunum gefunden worden. Im Northern Blot waren die Banden im Duodenum und Jejunum nur sehr schwach zu detektieren (s. **Abb.12**). Alle anderen getesteten Organe waren negativ für UGT1A3.

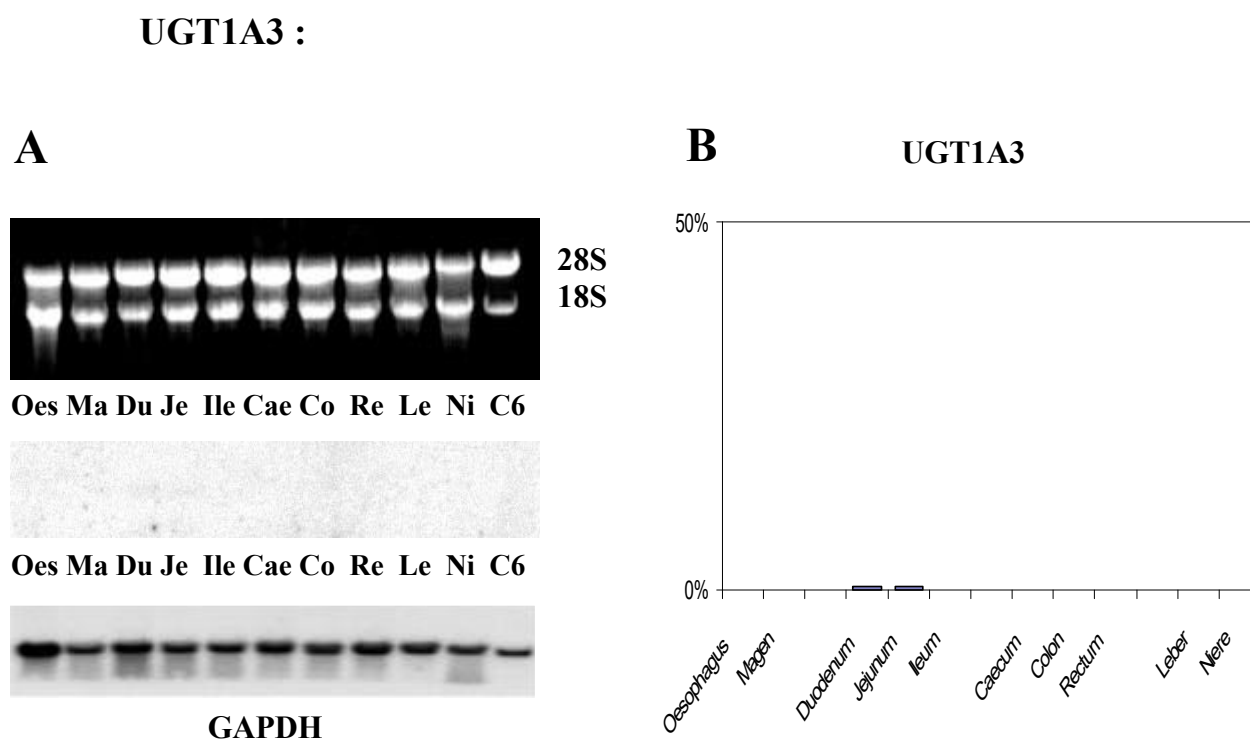


Abb. 12:

Figur A zeigt oben das RNA-Gel, das zur Standardisierung der Blots auf gleiche RNA-Menge diente. Pro Organ wurden 30µg Total-RNA aufgetragen. C6 steht für die RNA der C6-BU-1 Zelllinie (Gehirntumorzelllinie der Ratte), die keine UGT's der Familie1 exprimiert und als Negativkontrolle verwendet wurde. Die mittlere Membran wurde mit der UGT1A3- und die untere Membranen mit einer GAPDH-cDNA-Sonde hybridisiert. In Figur B sind die Signale der einzelnen Organe prozentual zur Summe aller Signale nach RNA-Abgleich dargestellt. **Oes** - Oesophagus, **Ma** - Magen, **Du** - Duodenum, **Je** - Jejunum, **Ile** - Ileum, **Cae** - Caecum, **Co** - Colon, **Re** - Rectum, **Le** - Leber, **Ni** - Niere.

3.2.5. Expression des UGT1A6

Das UGT1A6 war im Gastrointestinaltrakt das am höchsten exprimierte Isoenzym der UGT1A-Proteine (s. **Abb.13**). UGT1A6 war sowohl in der Leber als auch in der Niere hoch exprimiert. Erstaunlich war jedoch die hohe Expression des UGT1A6 im Magen, die mit der Expression der Leber vergleichbar war. Im Gastrointestinaltrakt waren auch hier wieder deutlich Gradienten zu erkennen. Im Verlauf des Dünndarms nahm die Expression des UGT1A6 wie bei den anderen UGT1A-Isoenzymen von proximal nach distal ab. Im Dickdarm war jedoch zum ersten Mal eine gegenläufige Tendenz zu erkennen. Hier nahm die mRNA-Expression vom Caecum zum Colon leicht zu, und überraschenderweise zeichnete sich das Rectum durch eine sehr starke UGT1A6-Expression aus.

UGT1A6:

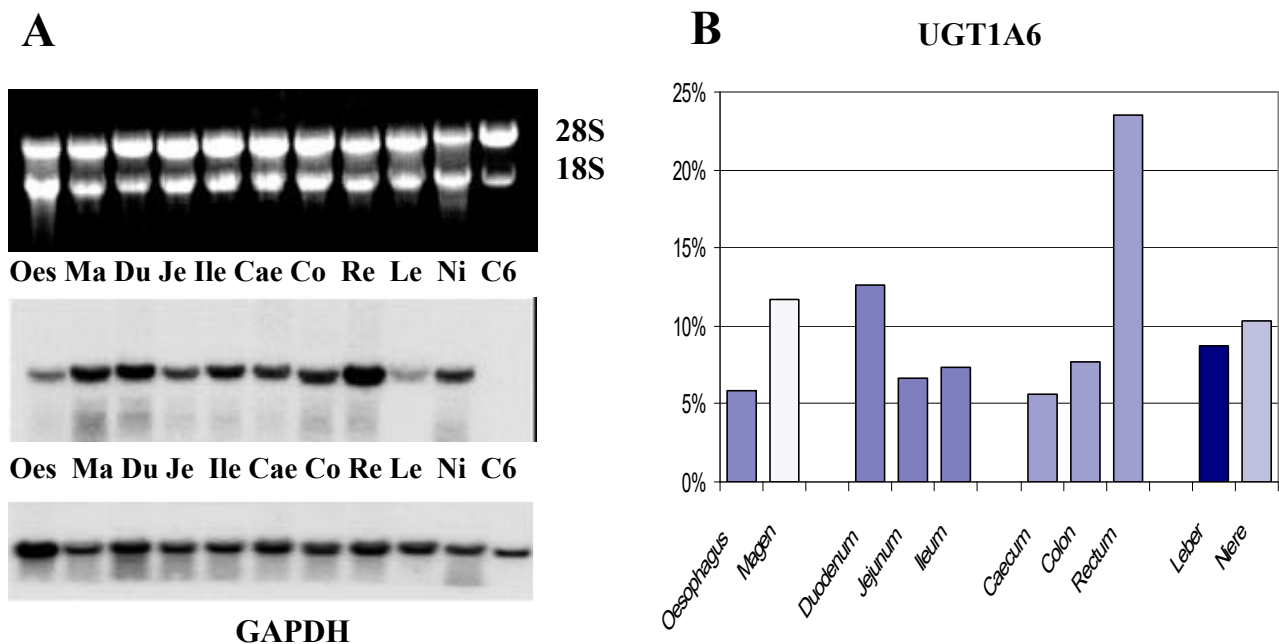


Abb. 13:

Figur A zeigt oben das RNA-Gel, das zur Standardisierung der Blots auf gleiche RNA-Menge diente. Pro Organ wurden 30µg Total-RNA aufgetragen. C6 steht für die RNA der C6-BU-1 Zelllinie (Gehirntumorzelllinie der Ratte), die keine UGT's der Familie I exprimiert und als Negativkontrolle verwendet wurde. Die mittlere Membran wurde mit der UGT1A6- und die untere Membranen mit einer GAPDH-cDNA-Sonde hybridisiert. In Figur B sind die Signale der einzelnen Organe prozentual zur Summe aller Signale nach RNA-Abgleich dargestellt. **Oes** - Oesophagus, **Ma** - Magen, **Du** - Duodenum, **Je** - Jejunum, **Ile** - Ileum, **Cae** - Caecum, **Co** - Colon, **Re** - Rectum, **Le** - Leber, **Ni** - Niere.

3.2.6. Expression des UGT1A7

Ähnlich wie das UGT1A2 zeichnete sich auch das UGT1A7 durch eine sehr geringe Expression in Leber und Niere aus, wo die mRNA-Expression an der Detektionsgrenze lag. Wieder exprimierten Oesophagus und Magen dieses UGT-Isoenzym nur schwach. Das Expressionsmuster des UGT1A7 ist jedoch im Gastrointestinaltrakt vergleichbar mit dem bereits beschriebenen Expressionsmuster von UGT1A1 und dem C-Terminus. Im Gastrointestinaltrakt bildet sich ein deutlicher Gradient aus, der im Duodenum die höchste Expression zeigte und anschließend von proximal nach distal sowohl im Dün- als auch im Dickdarm abfiel (s. **Abb.14**).

UGT1A7 :

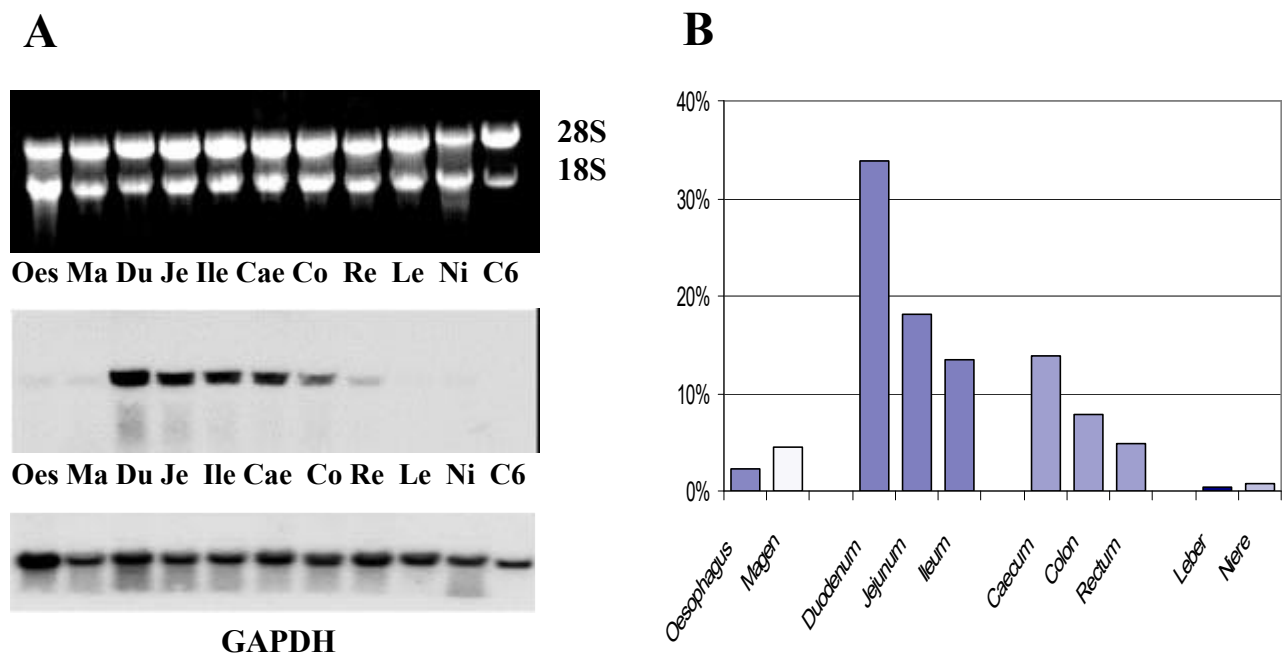


Abb. 14:

Figur A zeigt oben das RNA-Gel, das zur Standardisierung der Blots auf gleiche RNA-Menge diente. Pro Organ wurden 30µg Total-RNA aufgetragen. C6 steht für die RNA der C6-BU-1 Zelllinie (Gehirntumorzelllinie der Ratte), die keine UGT's der Familie1 exprimiert und als Negativkontrolle verwendet wurde. Die mittlere Membran wurde mit der UGT1A6- und die untere Membranen mit einer GAPDH-cDNA-Sonde hybridisiert. In Figur B sind die Signale der einzelnen Organe prozentual zur Summe aller Signale nach RNA-Abgleich dargestellt. **Oes** - Oesophagus, **Ma** - Magen, **Du** - Duodenum, **Je** - Jejunum, **Ile** - Ileum, **Cae** - Caecum, **Co** - Colon, **Re** - Rectum, **Le** - Leber, **Ni** - Niere.

3.2.7. Expression des UGT1A5, UGT1A8 und UGT1A9

UGT1A5 und UGT1A8, die in der RT-PCR der Leber ein positives Signal zeigten, wurden im Northern Blot getestet, waren jedoch nicht detektierbar. Die mRNA des Pseudogens UGT1A9 konnte jedoch wie in der RT-PCR in der Leber anhand eines Northern Blots detektiert werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß die UGT1A-Isoenzyme im Gastrointestinaltrakt eine komplexe gewebsspezifische Regulation aufweisen und hoch exprimiert waren. Mit Hilfe der RT-PCR konnten fünf der sieben bisher bekannten UGT1A-Transkripte im Darm der Ratte nachgewiesen werden: UGT1A1, UGT1A2, UGT1A3, UGT1A6 und UGT1A7. Die höchste Expression der UGT1A-Isoenzyme wurde im Duodenum gefunden.

Im Dünndarm sowie im Dickdarm trat für fast alle untersuchten UGT1A-Isoenzym eine mRNA-Expression auf, die von proximal nach distal abfiel. Einzige Ausnahme bildete hierbei das UGT1A6, das im Dickdarm einen aufsteigenden mRNA-Gradienten zeigte. Die gefundenen Expressionswerte im gastrointestinalen Trakt der Ratte lagen überraschenderweise in einigen Fällen über den mRNA-Mengen der Leber und übertrafen die Expressionshöhe der Niere bei weitem. Das am stärksten exprimierte UGT war das UGT1A6.

In der Leber konnte bisher UGT1A1 und UGT1A6 (Emi et al., 1995) nachgewiesen werden. Die Untersuchungen dieser Arbeit haben jedoch ergeben, daß zusätzlich die mRNA von UGT1A5, UGT1A7 und UGT1A9 exprimiert wird. Leber und Niere zeigen ein ähnliches Expressionsmuster, jedoch kein UGT1A2 und UGT1A3.

3.3. Induktionsversuche

Neben der gewebsspezifischen Regulation der Glukuronosyltransferasen war für das aktuell vorhandene Muster an Entgiftungsenzymen auch die Induzierbarkeit von großer Bedeutung. Die Enzyme der Phase-I, die P450 Cytochrome werden durch Enzyminduktoren wie Methylcholanthren (MC), Dexamethason (Dex), Phenobarbital (PB) und Clofibrat (CF) stark reguliert. Darüber hinaus ist bekannt, daß Induktoren vom Phenobarbital- und Methylcholanthren-Typ auch Enzyme der Phase-II (Glucuronosyltransferasen, Glutathion-S-Transferasen) induzieren können. In wieweit die UGT1A-Isoenzyme in den einzelnen Abschnitten des Gastroin-

testinaltrakts reguliert werden, sollte anhand von Induktionsversuchen näher untersucht werden. Dazu wurden Versuche mit mehrtägiger Behandlung mit den genannten Induktoren, wie unter **2.2.3.1.** beschrieben, durchgeführt.

Um die Frage zu klären, ob die verwendeten Induktoren eine Neuinduktion oder auch Reduktion von UGT1A-Isoenzymen bewirken und somit zu einem veränderten Expressionsmuster führen, wurden alle induzierten Organe erneut mit der etablierten RT-PCR getestet.

Erstaunlicherweise stellte sich für alle vier untersuchten Induktoren keine Änderung im Expressionsmuster dar. Um nun das Induktionsverhalten der UGT's in Bezug auf ihre Expressionshöhe quantitativ analysieren zu können, wurden auch hier Northern Blot-Analysen angefertigt.

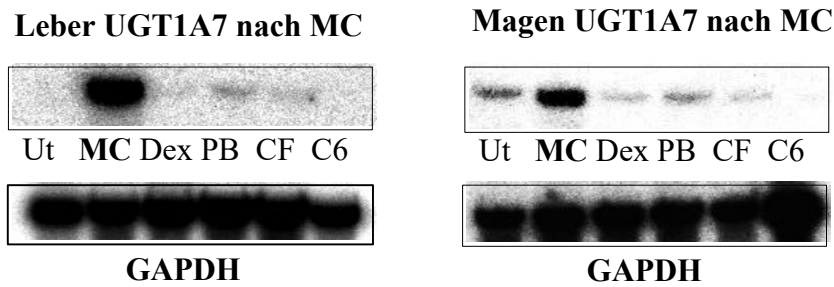
3.3.1. Induktion mit Methylcholanthren

Methylcholanthren wurde in einer Dosis von 40mg/kg über 3 Tage i.p. verabreicht. Nachdem die Organe entnommen und gespült wurden, konnte die isolierte RNA für Northern Blot-Analysen eingesetzt werden.

3.3.1.1. UGT1A7 nach Methylcholanthren-Behandlung

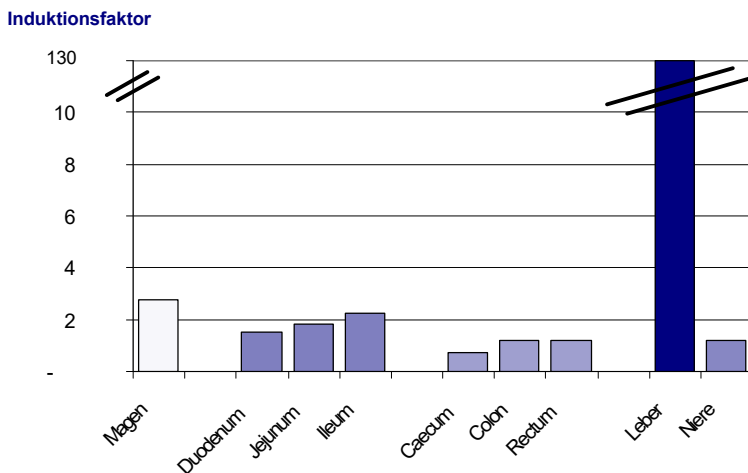
UGT1A7 war von allen Organen in der Leber am stärksten induzierbar. Konstitutiv ist diese Glukuronosyltransferase nur sehr schwach exprimiert, konnte aber durch Methylcholanthren (MC) über das 100-fache induziert werden. **Abbildung 15.** zeigt ein Northern Blot nach MC-Behandlung mit einer über 130-fachen Induktion der mRNA in der Leber.

Im Magen konnte das UGT1A7 um das 3-fache induziert werden (**s. Abb.15**), wobei die Niere keine Induktion aufwies. Demgegenüber stellte sich der Gastrointestinaltrakt nur mit einer mäßigen Induktion dar, die im Ileum mit Faktor 2,5 am höchsten war (**s. Abb.16**).

**Abb. 15:**

Dargestellt sind Northern Blot-Analysen von Leber und Magen nach MC-Behandlung. Es wurden jeweils 30 μ g Total-RNA/Lane aufgetragen. Die Membranen wurden mit UGT1A7- und GAPDH-cDNA- Sonden hybridisiert. Die mRNA der Leber zeigt eine über 130-fache Induktion. Die mRNA des Magens ist unter MC-Behandlung um den Faktor 3 erhöht.

UGT1A7 nach MC-Behandlung

**Abb. 16:**

zeigt die jeweiligen Induktionsfaktoren der UGT1A7-mRNA nach MC-Induktion des Gastrointestinaltrakts sowie der Leber und Niere. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Tieren.

3.3.1.2. UGT1A6 nach Methylcholanthren-Behandlung

UGT1A6 zeichnete sich schon durch eine hohe konstitutive mRNA-Expression in der Leber aus, konnte aber nach MC-Induktion immer noch um das 20-fache induziert werden (**s. Abb. 17**). Im Gegensatz zum UGT1A7 war die mRNA des UGT1A6 in der Niere um Faktor 4 erhöht. Auch im Magen wurde eine 4-fache Induktion festgestellt (**s. Abb.18**). Die Induktion des UGT1A6 im Gastrointestinaltrakt war vergleichbar mit dem Induktionsmuster des

UGT1A7. **Abb.19** zeigt deutlich, daß auch dort nur eine geringe Induktion um den Faktor 2 gefunden wurde.

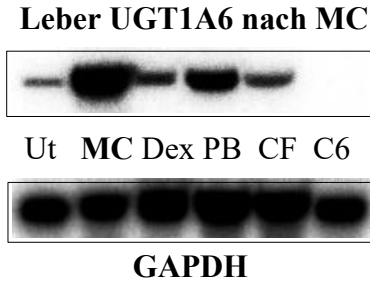


Abb. 17:

Dargestellt ist ein Northern Blot der Leber nach MC-Behandlung, wobei die UGT1A6-mRNA um das 20-fache induziert wurde. Es wurden jeweils 30µg Total-RNA aufgetragen und die Membran wurde mit einer UGT1A6- und GAPDH-cDNA-Sonde hybridisiert.

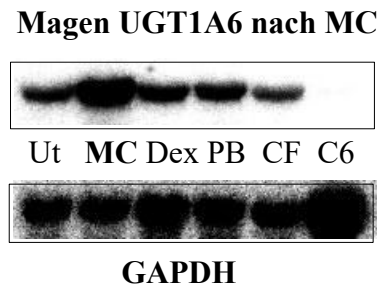
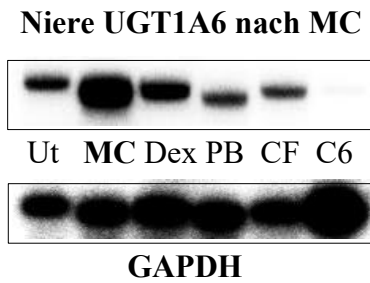


Abb. 18:

Dargestellt sind Northern Blot-Analysen von Niere und Magen nach MC-Behandlung. Es wurden jeweils 30µg total RNA/Lane aufgetragen. Die Membranen wurden mit UGT1A6- und GAPDH-cDNA-Sonden hybridisiert. Beide Organe zeigen eine Induktion der UGT1A6-mRNA um den Faktor 4.

UGT1A6 nach MC-Behandlung

Induktionsfaktor

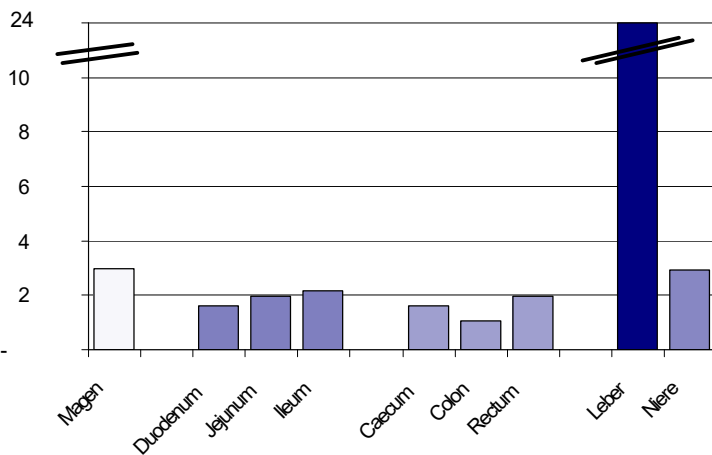


Abb. 19:

Abbildung 19 zeigt die jeweiligen Induktionsfaktoren der UGT1A7-mRNA nach MC-Induktion des Gastrointestinaltrakts sowie der Leber und Niere. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Tieren.

3.3.1.3. UGT1A1 nach Methylcholanthren-Behandlung

Das bisher entstandene Expressionsmuster von UGT1A6 und UGT1A7 wurde durch das UGT-Isoenzym 1A1 noch komplexer. Einer hohen Induzierbarkeit von UGT1A6 und UGT1A7 in der Leber steht im krassen Gegensatz einer Reduktion des UGT1A1 im selben Organ gegenüber. Der Northern Blot in **Abbildung 20** zeigt deutlich eine Reduktion um den Faktor 2,5 des UGT1A1 in der Leber. An dieser Stelle sei angemerkt, daß es sich bei diesem Versuch um den selben RNA-Blot handelte, der zuvor eine hohe Induktion von UGT1A6 und UGT1A7 zeigte. Die Niere zeigte wie das UGT1A7 keine Induktion durch die Behandlung mit MC.

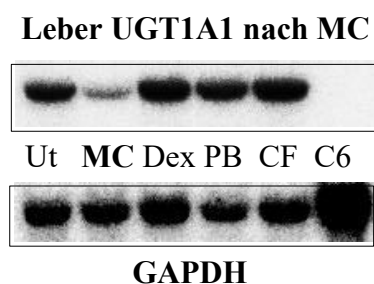
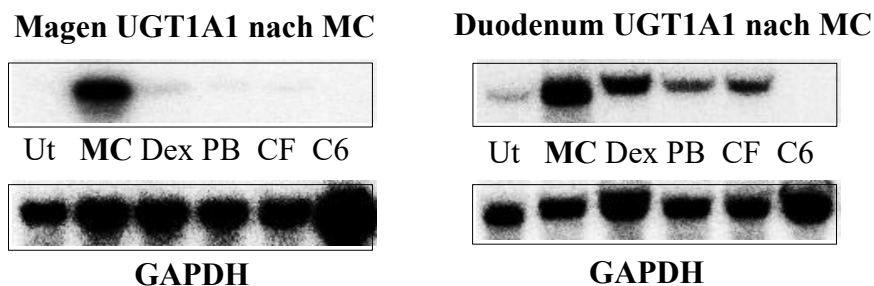


Abb. 20:

Dargestellt ist ein Northern Blot der Leber nach MC-Behandlung, wobei die UGT1A1-mRNA um den Faktor 2,5 reduziert wurde. Es wurden jeweils 30µg Total-RNA aufgetragen und die Membran wurde mit einer UGT1A1- und GAPDH-cDNA-Sonde hybridisiert.

Der Magen sowie das Duodenum wiesen bei der Betrachtung des UGT1A1 eine Besonderheit auf. In beiden Organen war eine große Variabilität im Induktionsverhalten der getesteten Tiere zu erkennen, die nicht durch einen Fehler in der Methode erklärt werden konnte. **Abbildung 21** zeigt 2 Northern Blots, die im Magen eine über 15-fache und im Duodenum eine 10-fache Induktion des UGT1A1 darstellen. Aus **Abbildung 22** ist nun deutlich zu erkennen, daß es sich bei den hohen Induktionsfaktoren jedes mal um das selbe Tier handelte. In den restlichen Organen des Gastrointestinaltrakts wurde im Jejunum, Ileum und Colon eine leichte Induzierbarkeit registriert.

**Abb. 21:**

Dargestellt sind Northern Blot-Analysen von Magen und Duodenum nach MC-Behandlung. Es wurden jeweils 30µg Total-RNA/Lane aufgetragen. Die Membranen wurden mit UGT1A1- und GAPDH-cDNA-Sonden hybridisiert. Die mRNA des Magens zeigt eine 15-fache Induktion. Die mRNA des Duodenums ist unter MC-Behandlung um den Faktor 10 erhöht.

UGT1A1 nach MC-Behandlung

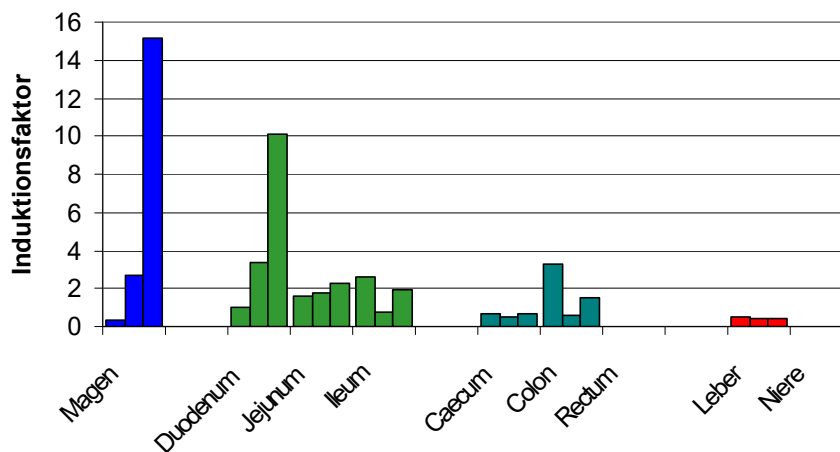
**Abb. 22:**

Abbildung 22 zeigt die jeweiligen Induktionsfaktoren der UGT1A1-mRNA nach MC-Induktion des Gastrointestinaltrakts sowie der Leber und Niere. Dargestellt sind die Einzelwerte von jeweils drei Tieren.

3.3.1.4. UGT1A9 nach Methylcholanthren-Behandlung

Die mRNA des Pseudogens UGT1A9 konnte in der Leber mit der RT-PCR sowie im Northern Blot detektiert werden. Um so überraschender war der Befund, daß die mRNA dieses Pseudogens durch Methylcholanthren induziert werden konnte. Der Northern Blot in **Abbildung 23** zeigt deutlich eine Induktion um den Faktor 2,4.

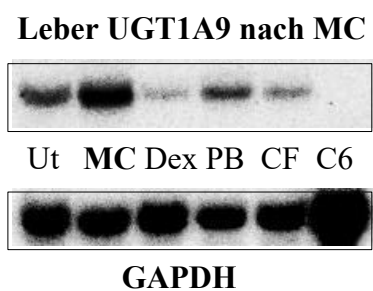


Abb. 23:

Dargestellt ist ein Northern Blot der Leber nach MC-Behandlung, wobei die UGT1A9-mRNA um den Faktor 2,4 induziert wurde. Es wurden jeweils 30µg Total-RNA aufgetragen, und die Membran wurde mit einer UGT1A9- und GAPDH-cDNA-Sonde hybridisiert.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß drei der sieben aktiven Glukuronosyltransferasen der Familie1 durch Methylcholanthren induzierbar waren. UGT1A1, UGT1A6 und UGT1A7 wiesen jedoch gewebsspezifisch stark voneinander abweichende Induktionsmuster auf. In der Leber konnte für UGT1A6 und UGT1A7 eine starke Induktion nach MC-Behandlung gezeigt werden. Erstaunlich war jedoch das Ergebnis, daß im selben Organ die mRNA des UGT1A1 durch Methylcholanthren reduziert wurde. Somit wurde eine komplexe Regulation der UGT1A-Isoenzyme durch Methylcholanthren gefunden, die nicht nur durch einen Regulationsmechanismus erklärt werden kann. Zusätzlich konnte die mRNA des Pseudogens UGT1A9 durch Methylcholanthren induziert werden.

Die Auswirkungen auf den Magen und die Niere waren deutlich geringer ausgeprägt. In der Niere konnte nur UGT1A6 durch Methylcholanthren induziert werden und im Magen war eine 3/4-fache Induzierbarkeit von UGT1A1, UGT1A6 und UGT1A7 durch MC-Behandlung nachweisbar. Insgesamt war die Induzierbarkeit im Gastrointestinaltrakt erheblich schwächer, als in der Leber.

3.4. Induzierbarkeit von Dexamethason, Phenobarbital und Clofibrat

3.4.1. Induzierbarkeit des UGT1A6

Uninduziert war UGT1A6 in der Niere sowie im Gastrointestinaltrakt der am stärksten exprimierte Vertreter. Nach Induktionsversuchen mit Dexamethason, Phenobarbital und Clofibrat zeigten nur drei der zehn getesteten Organe eine UGT1A6-mRNA-Erhöhung. Dabei verursachte Phenobarbital eine dreifache Induktion in der Leber, und durch Dexamethason konnte im Rectum die UGT1A6-mRNA um den Faktor 3,5 gesteigert werden. Im Colon wurde UGT1A6 nicht nur durch Dexamethason, sondern auch durch Phenobarbital und Clofibrat im gleichen Maße um das 3-fache induziert.

Die Induktionen sind in den **Abbildungen 24 und 25** anhand von Northern Blots dargestellt. Alle drei Induktoren wiesen im Gastrointestinaltrakt nur im Jejunum, Ileum und Caecum eine leichte Induktion der mRNA des UGT1A6 auf.

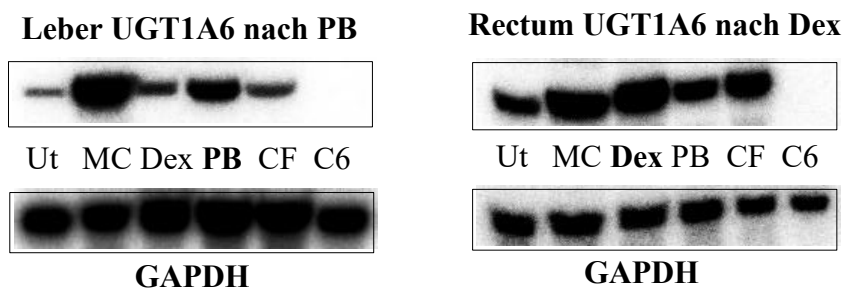


Abb. 24:

Dargestellt sind Northern Blot-Analysen der Leber nach Phenobarbital- und Rectum nach Dexamethason-Behandlung. Es wurden jeweils 30µg Total-RNA/Lane aufgetragen. Die Membranen wurden mit UGT1A6- und GAPDH-cDNA-Sonden hybridisiert. Die mRNA der Leber zeigt eine 3-fache Induktion, und das Rectum ist unter Dexamethason-Behandlung um den Faktor 3,5 erhöht.

Colon UGT1A6 nach Dex + PB + CF

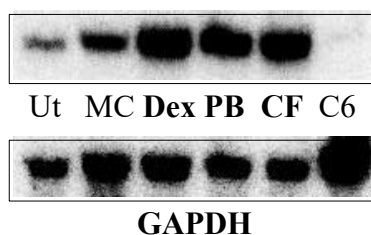


Abb. 25:

Dargestellt ist ein Northern Blot des Colons nach Dexamethason-, Phenobarbital- und Clofibrat-Behandlung, wobei die UGT1A6-mRNA bei allen drei Induktoren um den Faktor 3 induziert wurde. Es wurden jeweils 30µg Total-RNA aufgetragen und die Membran wurde mit einer UGT1A6- und GAPDH-cDNA-Sonde hybridisiert.

3.4.2. Induzierbarkeit des UGT1A1

Auch die Bilirubintransferase, das UGT1A1, ließ weder in Leber und Niere noch im Magen Effekte durch die drei verschiedenen Induktoren erkennen. Vom Gastrointestinaltrakt zeigte nur der Dünndarm (Duodenum bis Ileum) eine leichte Induktion durch Dexamethason, Phenobarbital und Clofibrat. Hierbei wurde die Expression der mRNA des UGT1A1 bei allen drei Induktoren immer auf das Doppelte induziert.

3.4.3. Induzierbarkeit des UGT1A7

Das UGT1A7 ist die Glukuronosyltransferase, die durch die drei eingesetzten Induktoren am wenigsten in den untersuchten Organen induziert wurde. Nur im Ileum konnten Phenobarbital und Clofibrat die UGT1A7-mRNA um das Doppelte erhöhen, und im Rectum wurde dieses Isoenzym um den gleichen Faktor durch Dexamethason induziert. Alle anderen Organe wie Leber, Niere, Magen, Duodenum, Jejunum, Caecum und Colon zeigten weder durch Dexamethason oder Phenobarbital noch Clofibrat Effekte in der Expression im Vergleich zur nicht induzierten mRNA des jeweiligen Organs.

Abschließend konnte festgestellt werden, daß Induktoren die dafür bekannt sind, Enzyme der Phase-I stark zu regulieren, wie Dexamethason, Phenobarbital und Clofibrat, im Gegensatz zu Methylcholanthren nur geringe Effekte auf die Familie der Glukuronosyltransferasen der Leber, Niere und des Gastrointestinaltrakts ausüben. Einzige Ausnahme dabei zeigte die mRNA des UGT1A6, die in der Leber durch Phenobarbital eine dreifache Induktion aufwies und durch Dexamethason in Colon und Rectum um das Dreifache gesteigert wurde.

Im gesamten Gastrointestinaltrakt wurde unter Dexamethason-, Phenobarbital- und Clofibrat-Behandlung nur Induktionsfaktoren zwischen 1 (nicht induziert) und 3 gemessen, wobei der überwiegende Teil eine Induktion um den Faktor 2 aufwies.

3.5. Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern

Nachdem das Expressionsmuster für die Leber, die Niere und den gesamten Gastrointestinaltrakt im *nicht induzierten* und *induzierten* Zustand auf RNA-Ebene erstellt und quantifiziert wurde, stellte sich nun die Frage, ob sich die entstandenen mRNA-Transkripte auch auf der Proteinebene wiederfinden lassen. Dazu sollten Antikörper hergestellt werden, die in der Lage sind, alle Glukuronosyltransferasen der Familie1 zu erkennen und wenn möglich auch darüber hinaus einzelne UGT1A-Isoenzyme zu unterscheiden.

3.5.1. Herstellung eines Antikörpers gegen den C-Terminus des UGT 1A1

Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Herstellung eines monospezifischen Antikörpers gegen UDP-Glukuronosyltransferasen der Familie1 (UGT1A). Da selbst bei hochspezifischen Autoantiseren gegen UGT1A-Proteine nie vollständig ausgeschlossen werden konnte, daß noch andere Proteine im Bereich von 50-60 kD erkannt werden, sollte ein Antikörper hergestellt werden, der alle UGT1A-Proteine erkennt. Zu diesem Zweck wurde der C-Terminus der humanen Bilirubintransferase (UGT1A1) in E.coli exprimiert (s. **Abb.26**).

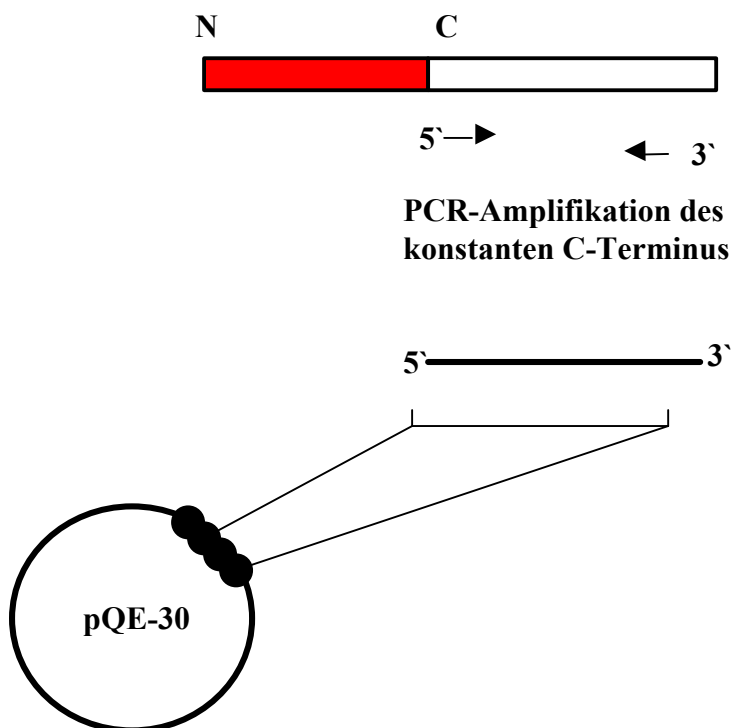


Abb. 26:

Über eine PCR-Amplifikation wurde der C-Terminus des humanen UGT1A1 in den Vektor pQE-30 kloniert und anschließend in E.coli transformiert.

In *E.coli* exprimiertes UGT1A1 neigt, wie andere in *E.coli* klonierte eukaryontische Proteine, zur Ausbildung unlöslicher, nicht kristalliner Strukturen, sogenannter „Inclusion bodies“. Die Reinigung von Proteinen aus „Inclusion bodies“ hat den Nachteil, daß sie mit einem Denaturierungsschritt verbunden ist, der einen erheblichen Ausbeuteverlust bewirkt. Zur Denaturierung wurde, wie unter **2.2.6.1.** beschrieben, 8 M Harnstoff eingesetzt.

Die „Inclusion bodies“, die vor allem aus denaturiertem C-terminalen UGT1A1 bestanden, wurden von den löslichen bakteriellen Bestandteilen getrennt. In einem zweiten Schritt wurde das rekombinante Protein in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und über die Elektro-Elution weiter aufgereinigt. **Abbildung 27** zeigt die einzelnen Schritte von der Induktion der transformierten *E.Coli* durch IPTG bis zum gereinigten Eluat. Das aufgereinigte Eluat konnte nach einer Volumenkonzentrierung durch Amicon-Zentrifugenröhrchen zur Immunisierung im Kaninchen verwendet werden. Die gewonnenen Antiseren wurden in der Immunfluoreszenz sowie im Western Blot eingesetzt.

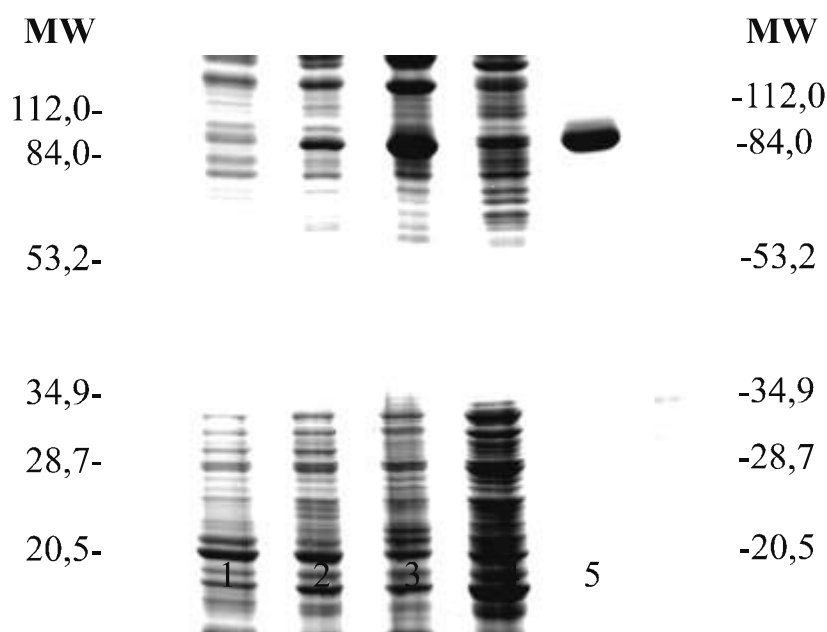


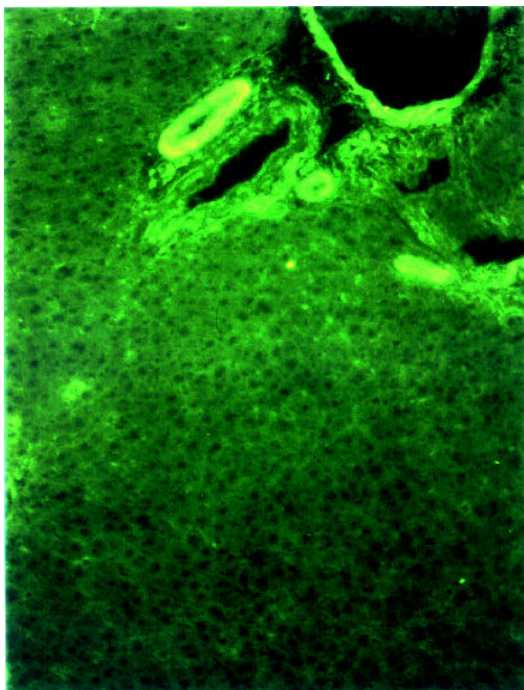
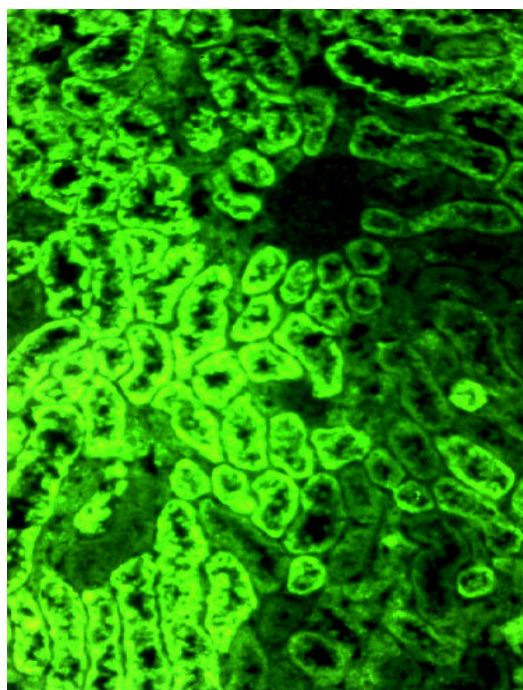
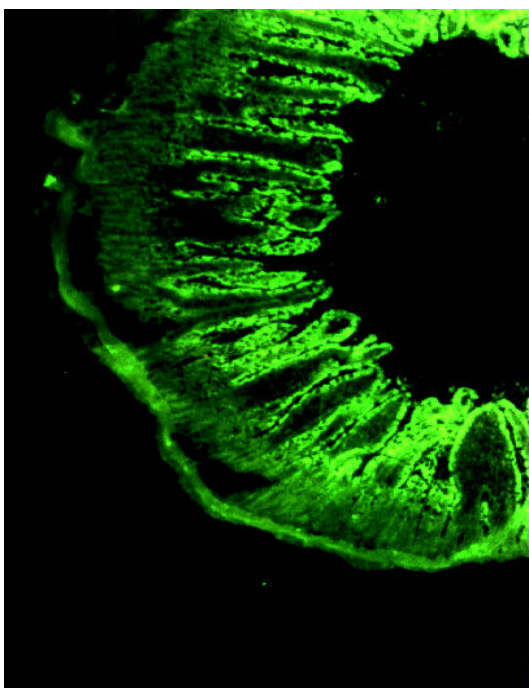
Abb. 27:

Dargestellt ist ein Coomassie Blue gefärbtes SDS-Gel. **1**= *E.Coli* mit pQE-30 uninduziert; **2** = *E.Coli* mit pQE-30 induziert mit IPTG; **3** = Pellet mit Inclusion bodies nach Ultraschall, **4** = Überstand; **5** = Eluat

Die Immunfluoreszenz ist neben der Western Blot-Analyse eine weitere Möglichkeit, UDP-Glukuronosyltransferasen der Familie 1 auf Proteinebene darzustellen, wobei die Immunfluoreszenz noch einen näheren Hinweis auf die Lokalisation im Gewebe geben kann. Zu diesem Zweck wurden nun humane Gefrierschnitte mit dem hergestellten Antikörper versetzt und die UGT's mit Hilfe eines DTAF-konjugierten Antikörpers detektiert.

Wie aus **Abbildung 28** zu ersehen ist, zeigten die Immunfluoreszenzen in Leber, Niere und im Duodenum ein positives Signal mit dem hergestellten monospezifischen Antikörper. Die Leber zeigte eine gleichmäßige positive homogene Verteilung. In der Niere befand sich die größte Konzentration der UGT's in den proximalen Tubuli, wohingegen die Glomeruli negativ waren. Im Duodenum wurden hauptsächlich die Epithelzellen der Mucosa angefärbt, wobei eine Konzentrationszunahme entlang der Krypt-Villusachse beobachtet werden konnte.

Im Vergleich dazu konnten in Western Blot-Analysen der Leber sowie im Gastrointestinaltrakt trotz geringer Serumverdünnung nur sehr schwache Signale detektiert werden.

A**B****C****Abb. 28:**

Dargestellt ist **A** ein Gefrierschnitt der Leber, **B** der Niere und **C** des Duodenums in einer Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gegen den C-Terminus der UGT1A-Proteine mit einem DTAF-konjugierten Antikörper (grün) angefärbt. Die Leber zeigt eine gleichmäßige positive (leuchtend grüne) Färbung. In **B** sind die proximalen Tubuli der Niere angefärbt und im Duodenum **C** sind die Epithelzellen der Mucosa positiv (leuchtend grün) angefärbt, wobei die Konzentration von den Krypten zu den Villi hin zunimmt.

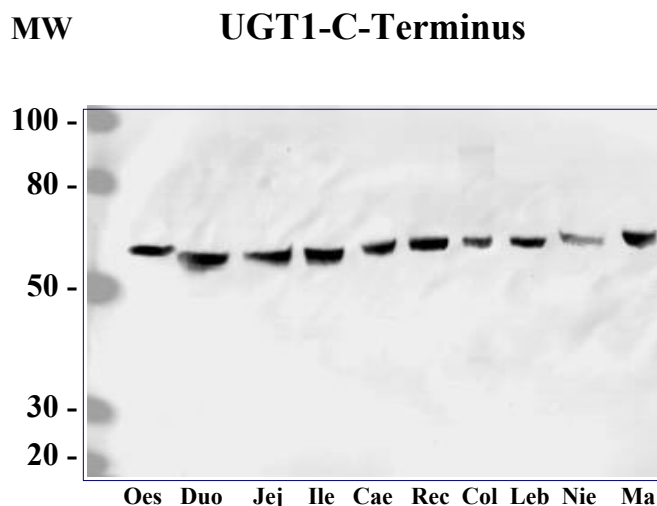
3.5.2. Herstellung monospezifischer Peptidantikörper

Um spezifische Antikörper zur Erkennung der UGT1A-Isoenzyme in der Ratte herzustellen, wurden nun kurze Peptide über ein zusätzliches Cystein an KLH (Keyhole limpet hemocyanin) gekoppelt und dieses Konjugat zur Immunisierung im Kaninchen eingesetzt. Die Peptide sind bereits von Ikushiro et al. 1995 erfolgreich verwendet worden, und in **Tabelle 3** sind ihre Sequenzen und Positionen aufgelistet. Die ausgewählten Sequenzen entstammen auch hierbei der hypervariablen Region des UGT1A-Genkomplexes. Die Sequenzhomologie der UGT1A-Isoenzyme untereinander war dabei so gering, daß auf der Ebene der Primärstruktur nicht mit Kreuzreaktionen zu rechnen war.

Tabelle 3:

Isoenzym	Position	Sequenz
UGT1 (C-Terminus)	516-529	GKGRVKKSHKSKTH
UGT1A1	136-149	AEFMASLEQSHFDA
UGT1A2	112-125	TMASIKKFFDLYAN
UGT1A6	81-94	YNLEELRTRYRSFG

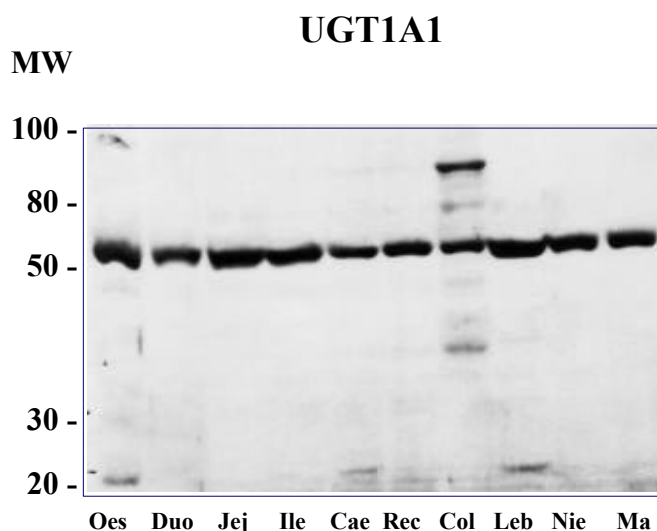
Nach dem Immunisierungsprotokoll, wie unter **2.2.7.** beschrieben, wurden die Peptidantikörper UGT1A1, UGT1A2, UGT1A6 und UGT1 (C-Terminus) hergestellt. Für 3 der 4 Konjugate wurden Antiseren erhalten, die stark mit den UGT1A-Proteinen reagierten. In Western Blot-Analysen wurde von jedem Organ (alle gastrointestinalen Abschnitte sowie Leber und Niere) 10µg mikrosomales Protein eingesetzt. In **Abbildung 29** ist ein Western Blot dargestellt, der mit dem monospezifisch hergestellten UGT1-C-Terminus-Antikörper behandelt wurde und somit alle UGT1A-Proteine erkennt. Der Blot zeigt deutlich, daß nicht nur in der Leber, sondern auch im gesamten Gastrointestinaltrakt UGT1A-Proteine vorhanden sind. Somit bestätigt dieses Ergebnis das Expressionsmuster, das auf RNA-Ebene bereits gefunden wurde.

**Abb. 29:**

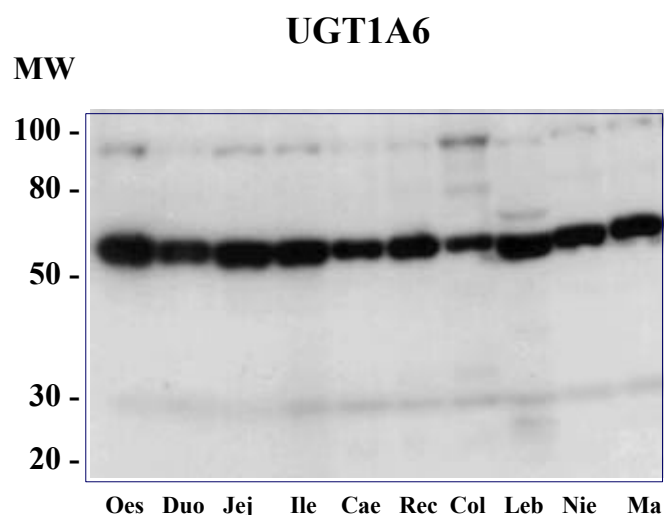
Dargestellt ist ein Western Blot mit 10µg Mikrosomen pro Organ. Als Antikörper wurde der monospezifisch hergestellte UGT1-C-Terminus-Antikörper verwendet (1:500). Zur Detektion wurde als 2. AK ein Goat-anti-rabbit alkalische Phosphatase (1:1250) eingesetzt.

Anschließend sollte nun untersucht werden, ob auch die isoenzymspezifisch hergestellten Antikörper im Western Blot zu detektieren waren. Um dabei Kreuzreaktivitäten mit den UGT's der Familie 2 (UGT2) auszuschließen, wurde zunächst der Antikörper gegen den C-Terminus der UGT1A-Proteine eingesetzt, um die hergestellten monospezifischen Antikörper durch Immunpräzipitation zu isolieren. Das immunpräzipitierte Protein wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und zur Western Blot Analyse verwendet. Anhand dieser Methode war es möglich, die Proteine des UGT1A1 und UGT1A6 zu detektieren. In **Abbildung 30** und **31** sind zwei Western Blots dargestellt, die unter der beschriebenen Methode hergestellt und mit dem ECL-System entwickelt wurden. Die Antikörper erkennen die Proteinbanden mit einem Molekulargewicht um 55 kD, was der typischen molekularen Größe der UGT1A-Proteine entspricht.

In allen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes sowie der Leber und Niere wurden starke Signale für die Proteine UGT1A1 und UGT1A6 verzeichnet. Auch diese Ergebnisse korrelieren mit den gefundenen Northern Blot Signalen.

**Abb. 30:**

Dargestellt ist ein Western Blot, mit 10µg Mikrosomen pro Organ, entwickelt mit dem ECL-System nach Immunpräzipitation. Als Antikörper wurde der monospezifisch hergestellte UGT1A1-Antikörper in einer Verdünnung von (1:500) verwendet.

**Abb. 31:**

Dargestellt ist ein Western Blot, mit 10 µg Mikrosomen pro Organ, entwickelt mit dem ECL-System nach Immunpräzipitation. Als Antikörper wurde der monospezifisch hergestellte UGT1A6-Antikörper in einer Verdünnung von (1:170) verwendet.

3.6. Untersuchung der Glukuronosyltransferasen (UGT1A)-Aktivität

Die Glukuronidierung durch Glukuronosyltransferasen stellt einen wichtigen Mechanismus zur Eliminierung toxischer Substanzen dar. Nachdem nun das Expressionsmuster der UGT1A-Proteine vorlag, stellte sich als nächstes die Frage, wie effektiv die gastrointestinale Barriere Schadstoffe zu entgiften vermag und in wieweit das bisher gefundene Expressions- und Induktionsmuster mit der Glukuronidierungsaktivität der UGT1A-Proteine übereinstimmt. Zu diesem Zweck wurde die Aktivität der UGT1A-Proteine durch einen Aktivitätsassay ermittelt. In diesem Test wird ^{14}C -markierte UDP-Glukuronsäure und Tests substrat in Gegenwart von UGT1A-Protein inkubiert. Dies führt zur Bildung ^{14}C -markierter Glukuronide, die wiederum dünn schicht chromatographisch aufgetrennt werden, um anschließend unter Verwendung des Phosphoimagers detektiert werden zu können.

Bei den Untersuchungen wurde als Tests substrat Paranitrophenol eingesetzt. Dieses phenolische Substrat ist ein „klassischer Vertreter“ für die Glukuronidierung der UGT1A-Proteine in der Leber. Mikrosomen aus den Organen Magen, Duodenum, Colon, Leber und Niere wurden uninduziert und nach Methylcholanthren-Behandlung, wie unter 2.2.2.4. beschrieben, isoliert und in den Aktivitätstest eingesetzt. Dabei wurden jeweils pro Organ nichtinduzierte- und methylcholanthreninduzierte Mikrosomen nebeneinander auf die Dünnschicht chromatographieplatte aufgetragen.

Abbildung 32 zeigt die Autoradiographie der untersuchten Mikrosomen, die mit Hilfe des Phosphoimagers ausgewertet wurden.

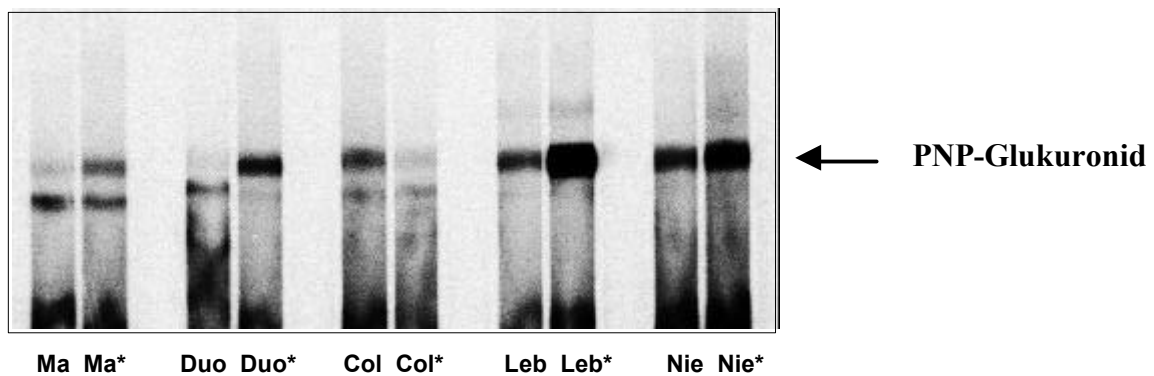


Abb. 32: Dargestellt sind die ^{14}C -markierten PNP-Glukuronide nach der Auftrennung auf einer Dünnschichtchromatographieplatte. Es wurden jeweils $50\mu\text{g}$ Protein/Lane aus den Mikrosomen von Magen, Duodenum, Colon, Leber und Niere mit und ohne MC-Behandlung aufgetragen und nach 3 Tagen Exposition im Phosphoimager ausgewertet. Die mit *markierten Organe wurden mit Methylcholanthren behandelt.

Zunächst fiel auf, daß die UGT1-Aktivität im Magen, Duodenum, der Leber und Niere nach Methylcholanthren-Behandlung eindeutig erhöht war. Im Magen und in der Niere war die Glukuronidierung um das 3-fache angestiegen, im Duodenum um das 12-fache und in der Leber konnte sogar die Aktivität um den Faktor 21 durch Methylcholanthren gesteigert werden (s. **Abb. 33**). Erstaunlicherweise war im Colon nach MC-Behandlung eine Reduktion der UGT1A-Aktivität zu beobachten.

UGT1-Aktivität mit p-Nitrophenol

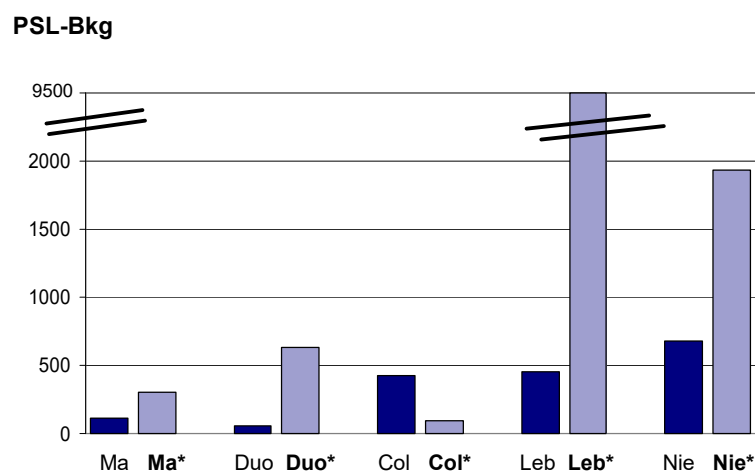


Abb. 33: Dargestellt sind die am Phosphoimager ausgewerteten ^{14}C -markierten PNP-Glukuronide aus Magen, Duodenum, Colon, Leber und Niere mit- und ohne MC-Behandlung. Die mit *markierten Organe wurden mit Methylcholanthren behandelt.

Im Vergleich zwischen dem uninduzierten RNA-Expressionsmuster aller UGT1A-Isoenzyme und den Mikrosomen der uninduzierten Organe fällt auf, daß das Aktivitätsmuster nicht mit dem gefundenen RNA-Muster übereinstimmt. Im RNA-Expressionsmuster waren die UGT1A-Isoenzyme im Magen am schwächsten exprimiert, dann folgte das Colon. Duodenum und Leber stellten die am höchsten exprimierten Vertreter der UGT's dar. Auf Aktivitätsebene sind die Unterschiede zwischen den *nichtinduzierten* untersuchten Organen wesentlich geringer. Hierbei zeigte das Duodenum die geringste Aktivität, unmittelbar gefolgt vom Magen. Colon und Leber zeigten uninduziert die gleiche Aktivität, und die Niere war das Organ mit der höchsten Glukuronidierung (**s. Abb. 33**).

Beim Aufschluß der Nahrung im Gastrointestinaltrakt werden neben den Nähr- und Aufbaustoffen auch zahlreiche schädliche Substanzen freigesetzt. Der Organismus ist gezwungen, diese Stoffe möglichst schnell und effizient zu entgiften, bevor sie ihr toxisches Potential entfalten können. Dies geschieht einerseits in der gastrointestinalen Mukosa im Rahmen des „First Pass Metabolismus“ und andererseits in der Leber, dem Hauptentgiftungsorgan.

Die UDP-Glukuronosyltransferasen (UGT's) bilden eines der wichtigsten Stoffwechsel- und Entgiftungssysteme im Organismus (Dutton, 1980). Bisherige Arbeiten haben sich hauptsächlich damit beschäftigt, das Expressionsmuster der Glukuronosyltransferasen in der Leber zu untersuchen. Es ist bekannt, daß auch im Darm die Glukuronidierung von endogenen und exogenen Substanzen eine wichtige Rolle spielt (Aitio et al. 1980).

Bei den bisherigen Untersuchungen wurde jedoch meist keine Unterscheidung innerhalb der einzelnen Darmabschnitte vorgenommen, sondern häufig der gesamte Darm zur Analyse eingesetzt.

Die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollten zeigen, wie das Expressionsmuster aller bisher bekannten UGT1A-Isoenzyme in den einzelnen gastrointestinalen Abschnitten verläuft. Um Aussagen über die Expressionshöhe treffen zu können, wurden die einzelnen UGT1A-Isoenzyme anhand von Northern Blot-Analysen quantifiziert.

Darüber hinaus sollte festgestellt werden, in welcher Weise „klassische Enzyminduktoren“ regulatorischen Einfluß auf die Expression in den untersuchten Organen ausüben. Mit verschiedenen monospezifischen Antikörpern, die im Kaninchen hergestellt wurden, sollte überprüft werden, ob sich die gefundenen mRNA-Transkripte auf der Proteinebene bestätigen lassen. Hierzu wurden einerseits Western Blot-Analysen durchgeführt und andererseits sollte die indirekte Immunfluoreszenz zusätzliche Informationen über die Lokalisierung in den verschiedenen Geweben aufzeigen.

Erste Aktivitätsassays mit den Mikrosomen der getesteten Organe sollten einen Hinweis auf die Effektivität der gastrointestinalen Barriere geben, Schadstoffe durch Glukuronidierung zu entgiften. Dazu wurde das Expressions- und Induktionsmuster mit der Glukuronidierungsaktivität der UGT1A-Proteine verglichen. Um den direkten Vergleich zu den Literaturdaten zu haben, wurden die Glukuronosyltransferasen der Familie I in der Leber und Niere stets mit charakterisiert.

4.1. Expression der UGT1A-Isoenzyme im Gastrointestinaltrakt der Leber und Niere

Bisher sind die Sequenzen von neun verschiedenen Isoenzymen der Glukuronosyltransferasen der Familie I (UGT1A) in der Ratte bekannt (Emi et al. 1995). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die UGT1A-Isoenzyme im Gastrointestinaltrakt der Ratte eine komplexe gewebsspezifische Regulation aufweisen und darüberhinaus hoch exprimiert waren.

Für die Ratte ist bereits beschrieben worden, daß in der Leber das UGT1A1 und das UGT1A6 exprimiert sind (Emi et al. 1995). Weiterhin konnten Emi et al. 1995 die mRNA des UGT1A7 nachweisen, jedoch erst nach Induktion der Leber mit Methylcholanthren.

Die Ergebnisse der RT-PCR und sogar die Ergebnisse der Northern Blot-Analysen lassen jedoch deutlich erkennen, daß die verwendete Methodik dieser Arbeit eine höhere Sensitivität gegenüber der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse besitzt. So konnte die Expression von UGT1A1 und UGT1A6 in der Leber bestätigt werden, doch darüber hinaus konnte außerdem gezeigt werden, daß entgegen früherer Daten auch signifikante Mengen an UGT1A7-mRNA in der uninduzierten Leber exprimiert sind.

Zusätzlich konnte erstmalig nachgewiesen werden, daß geringe Mengen an UGT1A5-mRNA und UGT1A8-mRNA konstitutiv in der Leber exprimiert werden. UGT1A5 ist ausschließlich nur in der Leber gefunden worden und scheint somit „Leber-spezifisch“ zu sein. Sogar die mRNA des Pseudogens UGT1A9 (Iyanagi, T., 1991) konnte mit Hilfe der RT-PCR nachgewiesen werden. Somit ist das Expressionsmuster der UGT1A-Isoenzyme in der Leber komplexer als bisher angenommen.

In der Niere konnte das bisher gefundene Expressionsmuster auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Dieses Organ besitzt ebenso wie die Leber UGT1A1, UGT1A6 und UGT1A7. Auch in diesem Organ konnten aufgrund der höheren Sensitivität der Methode geringe Mengen des Isoenzym UGT1A9 nachgewiesen werden. Dies ist nicht verwunderlich, da auch die Niere als Exkretionsorgan Entgiftungsfunktionen übernehmen muß. Die Hauptaufgaben der Niere bestehen aus der Filtration der meisten relativ kleinen Moleküle aus dem Blutplasma zur Bildung eines Ultrafiltrats und der selektiven Rückresorption des größten Teils des Wassers und anderer Moleküle aus dem Filtrat, so daß nur überschüssige und Abfallprodukte zur Ausscheidung übrig bleiben. Letztendlich ist die Niere auch für die Sekretion einiger zur Ausscheidung bestimmter Stoffe, die direkt aus dem Blut in das Filtrat abgegeben werden, ver-

antwortlich. Durch diese Funktionen, steht die Niere mit vielen toxischen Stoffwechselabfallprodukten in direktem Kontakt, die sie aus dem Organismus eliminieren muß.

Bei bisherigen Untersuchungen, in denen keine Unterteilung der einzelnen Darmabschnitte vorgenommen worden sind, konnten Emi et al. 1995 und Grove et al. 1997 im Darm der Ratte UGT1A1, UGT1A6 und UGT1A7 unter Verwendung einer RT-PCR nachweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten fünf der bisher bekannten intakten UGT1A-Transkripte in den einzelnen gastrointestinalen Abschnitten der Ratte nachweisen. Dabei konnte die Expression von UGT1A1, UGT1A6 und UGT1A7 in der RT-PCR sowie in Northern Blot-Analysen bestätigt werden, doch darüberhinaus konnte erstmals auch die mRNA-Expression von UGT1A2 und UGT1A3 in den untersuchten Darmabschnitten gezeigt werden. Auch diese Befunde unterstreichen erneut die höhere Sensitivität der verwendeten Methoden.

Bei der Betrachtung des Expressionsmusters im Gastrointestinaltrakt fiel zunächst auf, daß beginnend vom Oesophagus und Magen, über den Dünndarm bis hin zum Rectum durchgehend drei Hauptvertreter gefunden wurden. Es handelt sich hierbei um UGT1A1, UGT1A6 und UGT1A7, die selben Vertreter, die auch in Leber und Niere exprimiert wurden. Da diese drei Isoenzyme in allen untersuchten Organen vertreten sind, müssen sie eine wichtige Rolle im Organismus spielen.

Welche besondere physiologische Relevanz dem UGT1A1, der Bilirubintransferase, in der Leber zukommt, wird deutlich am Beispiel des Crigler-Najjar-Syndrom Typ-I (Chowdhury et al. 1994, Ritter et al. 1992, Moghrabi et al. 1993 und Seppen et al. 1994). In dieser Stoffwechselerkrankung führt der mutationsbedingte Totalausfall der UGT1A1-Isoform zum Verlust des einzig effektiven Eliminationsweges für das Hämabbauprodukt Bilirubin und damit zu den fatalen Folgen des Kernikterus. Da bisher keine Langzeittherapie entwickelt werden konnte, stellt die Lebertransplantation die einzige Möglichkeit der Therapie dar.

Die UGT1A- defiziente Gunn Ratte zeichnet sich ebenfalls durch eine Hyperbilirubinämie aus und wird daher als Tiermodell und für Gentherapiestudien eingesetzt (Iyanagi et al. 1989, ElAwady et al. 1990 und Iyanagi 1991).

Verschiedene Transplantationsversuche wurden durchgeführt, um festzustellen, welche Bedeutung dem Vorhandensein extrahepatischer UGT1A-Proteine im Stoffwechsel zukommt. In früheren Experimenten konnten Chowdhury et al. 1978 zeigen, daß durch die Transplantation

einer normalen Niere aus einer Wistar Ratte in eine homozygote Gunn Ratte die unkonjugierte Bilirubin-Konzentration im Serum rasch abfiel und Bilirubin-Glukuronide über die Galle eliminiert wurden.

Leider waren diese Ergebnisse nicht auf den Menschen übertragbar, da sich herausstellte, daß in der humanen Niere kein UGT1A1 vorhanden ist und somit auch keine Konjugation des toxischen Bilirubins in der Niere stattfinden kann.

Diese Befunde gaben einen ersten Hinweis darauf, daß zwar die Funktion und genetische Organisation der UDP-Glukuronosyltransferasen im Tiermodell und im Menschen vergleichbar sind, jedoch die Regulation, die unter anderem zu einer unterschiedlichen gewebsspezifischen Expression führt, nicht in allen Fällen von der Ratte auf den Menschen übertragbar ist.

Neuere Untersuchungen, in denen unterschiedlich lange Segmente des Jejunums aus gesunden Wistar Ratten in UGT1A-defiziente Gunn Ratten transplantiert wurden, zeigten ebenfalls den gewünschten Effekt (Jaffe et al. 1996). Zunächst erreichte die Bilirubinkonzentration im Serum jedoch nicht den Normalwert. Aus weiteren Experimenten kristallisierte sich heraus, daß je länger das transplantierte Jejunumsegment war, desto geringer wurde die Bilirubinkonzentration im Serum. Abschließende Untersuchungen machten deutlich, daß eine Dünndarmtransplantation mit einer zusätzlichen Phenobarbital-Behandlung der Hyperbilirubinämie entgegenwirkt und so ein normaler Bilirubinspiegel im Serum erreicht wird. So lange noch keine Möglichkeit besteht, dieses defekte Gen zu ersetzen, bleibt die Lebertransplantation als einzige Alternative. Zum jetzigen Zeitpunkt ist die Lebertransplantation auf einem höheren Entwicklungsgrad als die Darmtransplantation. Jedoch werden auf dem Gebiet der Darmtransplantation enorme und schnelle Fortschritte gemacht, so daß sie vielleicht in der Zukunft eine weitere Alternative zur Lebertransplantation darstellt.

Die im Gastrointestinaltrakt neu gefundenen konstitutiv exprimierten UGT1A2 und UGT1A3 sind weder in der Leber noch in der Niere exprimiert. UGT1A2 war im Oesophagus nicht exprimiert, trat erstmals im Magen dazu und war bis zum Rectum auf mRNA-Ebene detektierbar. UGT1A3 war hingegen nur im Dünndarm exprimiert. Diese beiden UGT1A-Isoenzyme stellen somit „Darm-spezifische“ Glukuronosyltransferasen der Familie 1 dar. Die komplexeste Ausstattung an UGT1A-Isoenzymen war im Duodenum und Jejunum gefunden worden. Das Auftreten spezifischer UGT1A-Vertreter, die nur im Intestinaltrakt oder nur in der Leber exprimiert sind, spricht für eine Arbeitsteilung zwischen der Leber als Hauptentgiftungsorgan und dem Darm.

Anhand der Northern Blot-Analysen konnte über das Expressionsmuster hinaus nun die Expressionshöhe der UGT1A-Isoenzyme in den einzelnen untersuchten Abschnitten gezeigt werden. Bisher sind die Ergebnisse dieser Arbeit die einzigen, die die Expression aller Glukuronosyltransferasen der Familie1 auf molekularer Ebene unter Verwendung einer RT-PCR und Northern Blot-Analysen im Gastrointestinaltrakt darstellen.

Bei der Betrachtung der einzelnen UGT1A-Isoenzyme auf molekularer Ebene fiel zunächst auf, daß sich im Dünn- sowie im Dickdarm Gradienten ausbildeten, die von proximal nach distal abfielen. Einzige Ausnahme bildete hierbei das UGT1A6, wo die mRNA-Expression im Dünndarm zunächst abfiel, jedoch im Dickdarm einen aufsteigenden mRNA-Gradienten zeigte. Schon in früheren *in vitro* Untersuchungen der Glukuronosyltransferasen in der Mukosa des Gastrointestinaltrakts konnten Hartiala et al. 1964 und Hänninen et al. 1968 zeigen, daß sich in der intestinalen Glukuronidierungsaktivität von oral zu aboral ein Gradient ausbildet, wobei die höchste Glukuronidierungsaktivität im Duodenum zu finden war.

Mit einem spezifisch hergestellten Antikörper, der in der Lage war, alle UGT1A-Proteine zu erkennen, konnte anhand der Immunfluoreszenz im Duodenum ein weiterer Gradient entlang der Krypt-Villus-Achse gezeigt werden. Hierbei war deutlich eine Konzentrationszunahme der Glukuronosyltransferasen der gesamten Familie1 von der Krypte zu den Villi hin zu erkennen. Auch dieses Ergebnis stimmt mit den bisher gefundenen Literaturdaten überein (Chowdhury et al. 1985). Weitere Untersuchungen konnten zeigen, daß sich die Glukuronosyltransferasen ausschließlich im endoplasmatischen Reticulum (ER) und in der Kernmembran befinden. In allen anderen Organellen waren die Glukuronosyltransferasen nicht detektierbar (Chowdhury et al. 1985).

Da die Epithelzellen der Mukosa im Darm eine erste Barriere gegen viele toxische Substanzen darstellen, ist es physiologisch sehr sinnvoll, daß die höchste Konzentration an Entgiftungsenzymen an der Stelle auftritt, wo der erste Kontakt mit den Schadstoffen stattfindet.

Überraschend war auch der Befund, daß die mRNA-Mengen der meisten UGT1A-Isoenzyme im Gastrointestinaltrakt der Ratte über den mRNA-Mengen der Leber lagen und auch die Expressionshöhe der Niere bei weitem übertrafen. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch dazu, daß die Glukuronosyltransferasen vor allem in der Leber, dem dominanten Entgiftungsorgan exprimiert sind. Nur die Bilirubintransferase, das UGT1A1, war konstitutiv in der Leber im Vergleich zu allen anderen Organen am höchsten exprimiert.

Hohe Expressionsraten der UGT1A-Isoenzyme wurden im Dünndarm gefunden. Der Dünndarm gliedert sich in drei Abschnitte: Duodenum (Zwölffingerdarm), Jejunum und Ileum. Er ist die Hauptresorptionsstätte für verdaute Nahrungsprodukte aus dem Magen-Darm-Kanal. Verdauung und Resorption werden durch die enorme Oberfläche des Dünndarms sehr gefördert. Diese kommt aufgrund von vier Baumerkmalen zustande. Durch die große Länge, der Ringfalten von Schleimhaut und Submukosa (Plicae circulares, früher Kerckring-Falten genannt), die im Jejunum besonders häufig sind, sowie die extrem zahlreichen Schleimhautzotten (fingerartige Vorstülpungen) und Schleimhautkrypten (Einstülpungen zwischen den Basen der Zotten, früher auch Lieberkühn-Krypten genannt) und dem ausgedehnten Mikrovillibesatz jeder einzelnen Darmoberflächenzelle, kommt dem Dünndarm eine wichtige physiologische Rolle zu.

Passend zu den Besonderheiten dieses Organs zeigen auch die Ergebnisse sehr deutlich, daß die höchste Expression der UGT1A-Isoenzyme im Duodenum gefunden wurde, wo physiologisch eine besonders starke Belastung an Schadstoffen durch eine große Oberfläche dieses Organs stattfindet. Darüberhinaus ist der Dünndarm nicht nur durch eine hohe Expression gekennzeichnet, sondern er stellt auch das komplexeste Muster an UGT1A-Isoenzymen verglichen zu den anderen untersuchten Darmabschnitten dar.

Der Magen zeichnete sich durch eine mittlere und der Oesophagus durch eine geringe Expressionshöhe aus. Der Oesophagus ist ein kräftiger Muskelschlauch, der die aufgenommene Nahrung oder Medikamente reflexartig vom Rachen zum Magen befördert. Da sich die Substanzen normalerweise nie länger als für wenige Sekunden im Oesophagus aufhalten und ein Rückfluß aus dem Magen durch einen physiologischen Verschlusmechanismus am Oesophagus-Magen-Übergang verhindert wird, war auch zu erwarten, daß die Expression in diesem Organ gering ist. Im Magen hingegen verbleiben die Substanzen für mehrere Stunden, um dort weiter mechanisch und chemisch zerkleinert zu werden. Hier findet also der erste längere Kontakt statt und daher sind im Magen Entgiftungsenzyme wie zum Beispiel Glukuronosyltransferasen sinnvoll und notwendig, um die ersten freiwerdenden toxischen Bestandteile für den Organismus unschädlich zu machen. Die gefundenen Ergebnisse stimmen auch mit der vorherrschenden Anatomie überein. So ändert die Schleimhaut an der Grenze vom Oesophagus zum Magen abrupt ihren Charakter. Aus der schützenden Schleimhaut mit mehrschichtigem Plattenepithel wird eine drüsenreiche Schleimhaut mit einschichtigem Säuleneithel. Die in der Ratte gefundenen organspezifischen Expressionsmuster unterscheiden sich erheblich von denen des Menschen.

Für den Menschen ist bisher auf molekularer Ebene ein vollständiges Expressionsmuster für die Leber, die Galle, den Magen (Strassburg et al. 1997) und das Colon (Strassburg et al. 1998) anhand einer Duplex-RT-PCR erstellt worden. Beiden Systemen gemeinsam ist eine komplexe Ausstattung an Glukuronosyltransferasen der Familie1 in der Leber und den extrahepatischen Organen. Wie in der Ratte, zeigten sich auch im humanen System gemeinsame Vertreter der UGT1A-Isoenzyme, die in der Leber, im Magen, sowie in der Galle und im Colon auftraten. Hierbei handelt es sich um UGT1A3 und UGT1A6 (Strassburg et al. 1998). Beim Menschen ist das UGT1A8 ausschließlich im Colon nachweisbar. Das humane UGT1A10 ist im Magen, der Galle und im Colon nachweisbar, jedoch nicht in der Leber (Strassburg et al. 1998). Diese Befunde lassen darauf schließen, daß auch beim Menschen UGT1A-Isoformen auftreten, die spezifisch nur für den Darm oder die Leber sind und die Hypothese der Arbeitsteilung unterstützen. Im Gegensatz zur Ratte zeigte sich das komplexeste Muster mit sieben verschiedenen UGT1A-Vertretern im Colon des Menschen. Leber und Galle waren jeweils durch fünf, der Magen nur durch vier Vertreter charakterisiert.

Die Multigenfamilie der Glukuronosyltransferasen hat sich ebenso wie die große Familie der P450-Cytochrome im Laufe der Evolution an das immer größer werdene Substratspektrum durch Divergenz angepaßt. Die Regulation der Glukuronosyltransferasen führt zu einer gewebsspezifischen Expression. Diese Genregulation der einzelnen UGT1A-Isoformen scheint angepaßt zu sein an das jeweilige zu glukuronidierende Substratspektrum.

In der medikamentösen Therapie stellt die Magen- und Colonmukosa die häufigste und erste Kontaktstelle dar. Die zelluläre Metabolisierung dieser Schleimhäute hat großen Einfluß auf die Effizienz und Absorption von Medikamenten. So könnte sich das humane Colon im Laufe der Zeit an das medikamentöse Spektrum durch eine große Komplexität angepaßt haben. Die höchste Expression wurde beim Menschen in der Leber gefunden. Die extrahepatischen Organe, wie der Magen, die Galle und das Colon zeigten im Vergleich untereinander keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer mRNA-Expression (Strassburg et al. 1998).

Unter Verwendung der hergestellten monospezifischen Antikörper im Kaninchen, konnte das gefundene mRNA-Muster der Glukuronosyltransferasen der Familie1 auf Proteinebene größtenteils bestätigt werden. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der Glukuronosyltransferasen war es bisher nicht gelungen UGT1A-isoformspezifische Antikörper herzustellen (Coughtrie et al. 1987 und Ikushiro et al. 1995). Dies hatte zur Folge, daß die Charakterisierung und Identifikation der UGT-Expression nur begrenzt möglich war.

Es ist bekannt, daß Patienten mit chronischer Hepatitis D vermehrt zur Bildung von Autoantikörpern neigen. 13 % dieser Patienten bilden Autoantikörper gegen Glukuronosyltransferasen der Familie1 (Crivelli et al. 1983 und Strassburg et al. 1996). Da selbst bei hochspezifischen Autoantiseren dieser Patienten nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, daß nur eine Spezifität gegen UGT1A-Proteine vorliegt und nicht doch noch andere Proteine im Bereich von 50 kDa- 60 kDa erkannt werden, schienen diese Patientenserum ungeeignet für eine nähere Charakterisierung der UGT1A-Proteine auf Proteinebene zu sein.

Die Sequenzhomologie des UGT1A-Locus zwischen Mensch und Ratte beträgt 86,7 % (Owens et al. 1995). Bezogen auf den Carboxyterminalen Teil der UGT1A-Isoformen ist die Sequenzhomologie sogar über 90 % (Ritter et al. 1992). Da das Konstrukt des humanen UGT1A1 bereits zur Verfügung stand und aufgrund der hohen Sequenzhomologie beider Arten, wurde zunächst ein Antikörper gegen den C-Terminus der humanen Bilirubintransferase (UGT1A1) hergestellt, der in der Lage war, alle UGT1A-Proteine zu erkennen. Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte anhand von indirekten Immunfluoreszenzen die Lokalisation der Glukuronosyltransferasen der Familie1 in verschiedenen Geweben gezeigt werden.

In der gesamten Leber war eine homogene Verteilung der Glukuronosyltransferasen zu erkennen, wobei hauptsächlich die Hepatozyten positiv angefärbt waren. Eine der wichtigsten Aufgaben der Leber besteht in der Entgiftung von Stoffwechselabbauprodukten, die ihr über das Blut zugeführt werden. Die Leberläppchen sind dabei anatomisch so aufgebaut, daß der Kontakt zwischen den Leberzellen und dem strömenden Blut am größten ist. Somit werden die Entgiftungsenzyme hauptsächlich in den Hepatozyten benötigt, wo der direkte Kontakt mit toxischen Schadstoffen stattfindet.

In der Niere wurde die größte Konzentration der UGT1A-Proteine in den Epithelzellen der proximalen Tubuli gefunden. Die Glomeruli waren eindeutig negativ. Die stark gewundenen Nierenkanälchen (Tubulis renalis) gliedern sich in vier histologisch-physiologische Hauptabschnitte, die verschiedene Aufgaben erfüllen. So umfaßt das proximale Tubuluskonvult den längsten und am stärksten gewundenen Teil des Nierenkanälchens und bildet die Hauptmasse der Nierenrinde. Hier werden etwa 75 % aller Ionen und des Wassers rückresorbiert.

Daraus läßt sich schließen, daß der Kontakt mit den zur Ausscheidung bestimmten Schadstoffen am Ort der Rückresorption im proximalen Tubuluskonvult stattfindet und deshalb an dieser Stelle eine Ausstattung an Entgiftungsenzymen unentbehrlich ist. Da die meisten toxischen Substanzen schon in der Leber glukuronidiert werden, um über die Niere ausgeschieden

zu werden, ist die Dominanz der Niere als Entgiftungsorgan geringer anzusehen als das der Leber. Dies würde auch erklären, warum das gefundene Expressionsmuster und die Expressionshöhe der einzelnen UGT1A-Isoformen in der Niere geringer und weniger komplex ausfallen, als in der Leber.

Auch im Darm sind die UGT1A-Proteine in den Epithelzellen der Mukosa lokalisiert, wobei deutlich eine Konzentrationszunahme entlang der Krypt-Villusachse zu erkennen war. Mit Ausnahme der meisten Lipide gelangen alle resorbierten Nahrungsstoffe mit dem venösen Blut aus dem Dünndarm über die Pfortader (Vena portae) direkt zur Leber, bevor sie in den allgemeinen Kreislauf eintreten. An dieser Stelle wird erneut die besondere Stellung der Leber als Hauptentgiftungsorgan des Körpers deutlich. Andererseits unterstreicht es jedoch auch die wichtige Bedeutung des Dünndarms als erste Barriere der oralen Aufnahme. Anhand dieser physiologischen Gegebenheiten ließe sich auch erklären, warum die höchsten Expressionen einzelner UGT1A-Isoformen in der Leber und vor allem im Dünndarm gefunden wurden.

Auch der Befund von typisch „Darm-spezifischen“- (UGT1A2 und UGT1A3) und „Leber-spezifischen“- (UGT1A5) Glukuronosyltransferasen könnte eine komplementäre Ergänzung darstellen, um ein möglichst breites Spektrum an Substanzen zu eliminieren und somit eine optimale Entgiftung zu gewährleisten. Die drei Hauptvertreter UGT1A1, UGT1A6 und UGT1A7, die im gesamten Gastrointestinaltrakt, sowie der Leber und Niere konstitutiv exprimiert sind, könnten eine sogenannte „Grundausrüstung“ der Phase-II Entgiftung darstellen.

Auch im humanen System wurden UGT1A-Vertreter gefunden, die in der Leber, im Magen, in der Galle und im Colon exprimiert sind. Es handelt sich hierbei um UGT1A3 und wie in der Ratte um das UGT1A6 (Strassburg et al. 1998).

Nach der Immunhistochemischen Betrachtung konnten trotz geringer Verdünnungen des Antikörpers im Western Blot nur sehr schwache Signale detektiert werden.

Um mit einer anderen Methode spezifische Antikörper zur Erkennung der einzelnen UGT1A-Proteine herzustellen, wurden nun kurze Peptide verwendet (Ikushiro et al. 1995). Die Sequenzen der Peptide stammen aus der hypervariablen Region des UGT1A-Genkomplexes, so daß auf der Ebene der Primärstruktur nicht mit Kreuzreaktionen zu rechnen war. Da die synthetisierten Peptide nur Haptene darstellen, die allein nicht immunogen sind, wurden die Peptide über ein zusätzliches Cystein an KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) gekoppelt. Das

Konjugat bietet nicht nur den Vorteil nun vom Immunsystem erkannt zu werden, sondern aufgrund der Artenfremdheit ist auch eine stärkere und spezifischere Immunantwort zu erwarten. Nach dieser Methode wurde, neben anderen Antikörpern, erneut ein monospezifischer Antikörper hergestellt, der den C-Terminus und somit alle Glukuronosyltransferasen der Familie 1 erkennt. Dieser Antikörper war nun in der Lage im Western Blot starke Signale für alle untersuchten Organe zu detektieren.

Erstmals ist es gelungen, mit den hergestellten isoenzymspezifischen Antikörpern, UGT1A1 und UGT1A6 auf Proteinebene nachzuweisen. In allen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts sowie der Leber und Niere konnten starke Signale für beide Glukuronosyltransferasen gezeigt werden. Um sicher zu gehen, daß die isospezifischen Antikörper nicht mit den Glukuronosyltransferasen der Familie 2 kreuzreagieren, wurde zunächst der C-terminale Antikörper eingesetzt, um die gebundenen Proteine durch Immunpräzipitation zu isolieren. Trotz der vorweggeschalteten Immunpräzipitation bleibt jedoch noch die Frage nach der Spezifität der Antikörper innerhalb der Familie 1, offen. So könnte die Klonierung N-terminaler Sequenzen der UGT1A-Isoformen den Nachweis erbringen, daß die hergestellten Antikörper tatsächlich monospezifisch ausgerichtet sind und nicht untereinander kreuzreagieren.

4.2. Induktionsverhalten der Glukuronosyltransferasen der Familie 1

Aufgrund der Anatomie des Gastrointestinaltrakts liegt es nahe, daß die intestinalen Gewebe eine raffinierte Kontrolle der Entgiftung benötigen und daß daher die Ausstattung an Entgiftungsenzymen nicht nur spezifisch für jedes Organ ist, sondern auch von proximal zu distal variiert.

Um weitere Einblicke in die Regulation der Glukuronosyltransferasen zu bekommen, wurden Induktionsversuche durchgeführt. Für die Phase-I Enzyme der Entgiftung, die P450 Cytochrome, ist bereits bekannt, daß sie durch Induktoren wie Methylcholanthren (MC), Dexamethason (Dex), Phenobarbital und Clofibrat stark reguliert werden (Harada et al. 1981, Yabusaki et al. 1984a, Yabusaki et al. 1984b, Emi et al. 1988, Raval et al. 1990 und Whitlock et al. 1996).

Aus der Familie 1 der Glukuronosyltransferasen wurden von Emi et al. 1995 bereits das UGT1A6 und das UGT1A7 der Ratte als polyzyklische Hydrocarbone (PAH)-induzierbare Gene der Leber identifiziert. Weiterführende Untersuchungen für das UGT1A6 der Ratte

wurden von Münzel et al. 1994 durchgeführt, wobei die Induzierbarkeit des UGT1A6 durch TCDD (2,3,7,8,-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) in hepatischen und extrahepatischen Geweben untersucht wurde. Die Untersuchung auf Aktivitätsebene wurde anhand von 6-Hydroxychrysen durchgeführt, das vorwiegend von UGT1A6 umgesetzt wird (Bock et al. 1992 und Bock et al. 1993). Es konnte gezeigt werden, daß die Induzierbarkeit in der Leber (10-fach) weitaus besser als in den extrahepatischen Geweben (2-fach) ausfiel. Darüber hinaus stimmten die Messungen im Northern Blot auf RNA-Ebene gut mit den Aktivitätsdaten überein. Anhand dieser Befunde konnte dargelegt werden, daß die Regulation der Induktion durch TCDD, einem Induzenten des PAH-Typs, in hepatischen und extrahepatischen Geweben bereits auf der RNA-Ebene meßbar ist und daß später greifende Regulationsmechanismen zumindest für das UGT1A6 der Ratte eine untergeordnete Rolle spielen. Leider wurde in diesen Untersuchungen der Gastrointestinaltrakt nicht mit einbezogen.

Die Ergebnisse der Methylcholanthren-Induktion dieser Arbeit weisen für das UGT1A1, UGT1A6 und das UGT1A7 gewebsspezifisch stark voneinander abweichende Induktionsmuster auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß eine komplexe Regulation durch Methylcholanthren in Abhängigkeit vom regulierten Gen und vom Gewebe stattfindet. Die höchste Induzierbarkeit war für das UGT1A6 und UGT1A7 in der Leber gefunden worden. Die Auswirkungen auf Niere und Magen waren deutlich geringer ausgeprägt im Vergleich zur Leber. Auch die Induzierbarkeit im Gastrointestinaltrakt fiel erheblich schwächer aus als in der Leber. So stehen einer über 100-fachen Induktion des UGT1A7 nach Methylcholanthren-Behandlung in der Leber Induktionsfaktoren von vier im Magen und der Niere sowie drei im Gastrointestinaltrakt gegenüber. Die Ergebnisse zeigen eine konstitutive Expression des UGT1A-Genkomplexes, die im Gegensatz zu den Phase-I-Enzymen der Entgiftung (P450-Cytochrome) nur eine geringe Induzierbarkeit aufweisen.

Erstaunlich war auch der Befund des UGT1A1 in der Leber. So wurden in diesem Organ für das UGT1A6 und UGT1A7 nach Methylcholanthren-Behandlung hohe Induktionsfaktoren gefunden. Für die mRNA des UGT1A1 konnte nach Induktion jedoch im selben Organ eine 3-fache Reduktion nachgewiesen werden. Somit wurde eine komplexe Regulation des UGT1A-Genkomplexes durch Methylcholanthren gefunden, die nicht nur alleine durch einen Regulationsmechanismus erklärt werden kann. Ähnliche Phänomene wurden auch beim Einfluß des Schilddrüsenhormons L-T3 (3,3',5 triiodo-L-thyronin) auf die mRNA-Expression der Glukuronosyltransferasen beobachtet. In Versuchen mit L-T3 stellten Masmoudi et al. 1996

1996 fest, daß es die mRNA-Expression von UGT1A6 erhöht, gleichzeitig aber dasselbe Hormon die mRNA-Expression von UGT1A1 reduziert.

Die Expression der individuellen UGT1A-Isoenzyme muß unterschiedlichen Kontrollmechanismen unterliegen. Es ist bekannt, daß spezifische nukleare Rezeptoren dabei eine wichtige Rolle spielen.

So beginnt der Mechanismus der Methylcholanthren- oder anderer polyzyklischer Hydrocarbone (PAH)-vermittelten Induktion der UDP-Glukuronosyltransferasen mit der Bindung des Induktors an den Arylhydrocarbon-Rezeptor (Ah-Rezeptor). Der Ah-Rezeptor wird daraufhin in Abhängigkeit des ARNT-Proteins (Ah receptor nuclear translocator) in den Zellkern transportiert, um dort als Ah-Rezeptor-ARNT-Komplex an sogenannte „Xenobiotic Responsive Elements“ (XRE) am Promotor zu binden. XRE-Elemente wurden zum Beispiel in den Promotorregionen der Cytochrom 1A-Gene sowie dem UGT1A6 des Menschen und der Ratte gefunden (Münzel et al. 1998 und Emi et al. 1996). Inzwischen häufen sich jedoch die Hinweise darauf, daß dieses einfache Modell die PAH-vermittelte Induktion nur sehr unvollständig beschreibt. Beim Ah-Rezeptor handelt es sich um ein Phosphoprotein. *In vitro* Behandlung von Cytosol oder von induzierten Kernextrakten mit alkalischer Phosphatase verhindert die Bindung des Ah-Rezeptors an die XRE-Elemente, was bereits auf eine wichtige Rolle der Phosphorylierung hindeutet. So konnten Chen et al. 1996 weiterhin zeigen, daß bestimmte Modulatoren der Aktivität der Proteinase C die transkriptionale Induktion des Cytochrom P450 1A1 durch Methylcholanthren beeinflussen. Da weder die Translokation des Ah-Rezeptors in den Zellkern noch seine Bindung an die XRE-Elemente durch die Modulierung der Aktivität der Proteinase C beeinflusst werden, wurde eine Wirkung der Proteinase C über weitere DNA-Elemente vorgeschlagen. Dies wäre zum Beispiel das AP-1 (activator protein) Element (Chen et al. 1996). Tatsächlich wurden AP-1 Elemente in der Promotorregion eines anderen PAH-induzierbaren Enzyms gefunden, nämlich dem Cytochrom P450 1A2 (Quattrocchi et al. 1994).

Untersuchungen für das Cytochrom P450 2A8 von Tohkin et al. 1996 machten ebenfalls deutlich, daß der Phosphorylierungsstatus eine wichtige Rolle bei der Methylcholanthren-Induktion spielt und weisen auf ein Mitwirken von c-Jun und c-Fos in der MC-abhängigen Signaltransduktionskette hin. Es wurde gezeigt, daß die Hemmung der Serin-Threonin Phosphoproteinphosphatasen-1 und -2A ebenfalls zu einer Potenzierung der MC-abhängigen Induktion führen kann. Der Mechanismus scheint die Induktion von c-Jun und c-Fos zu indu-

zieren und eine AP-1 abhängige Transkription einzuleiten. **Abbildung 34** soll den dargestellten Mechanismus noch einmal verdeutlichen.

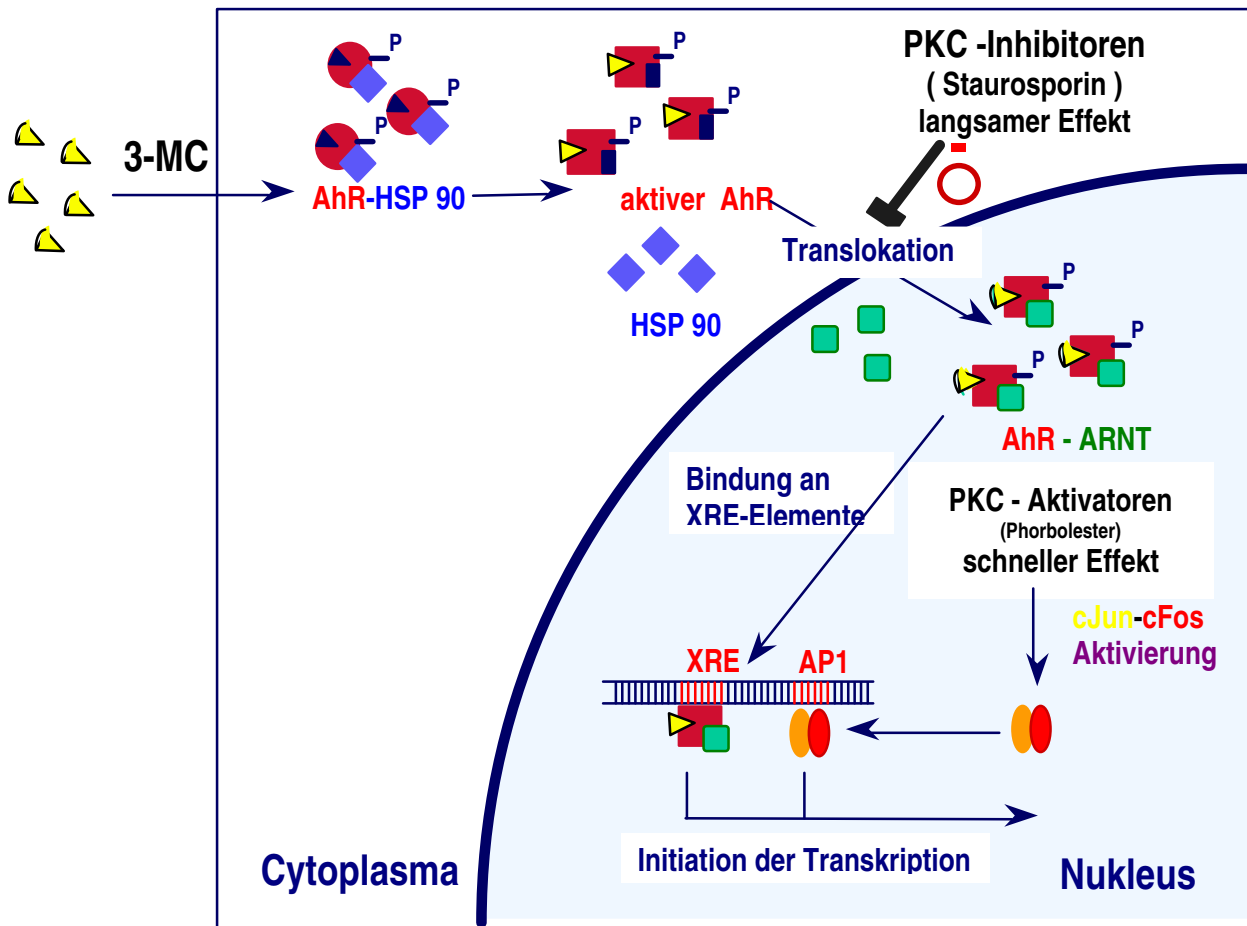


Abb. 34: Dargestellt ist der Signaltransduktionsweg des Methylcholanthrens über die Bindung an den Ah-Rezeptor bis zur Aktivierung der Transkription.

Enan et al. 1994 gibt erste Hinweise auf verschiedene Aktivierungsmechanismen. In Versuchen mit TCDD konnte er zeigen, daß die Induktion auf zwei verschiedenen Wegen abläuft. TCDD wirkt wie Methylcholanthren über die Bindung an den Ah-Rezeptor, der dann über die Translokation in den Zellkern als Ah-Rezeptor-ARNT-Komplex an XRE-Elemente bindet und somit die Transkription aktiviert. Für die zweite Möglichkeit der Aktivierung scheint nur der Ah-Rezeptor allein notwendig zu sein. Dann bewirkt jedoch die Bindung des TCDD an den Ah-Rezeptor eine Protein-Kinase-Aktivierung, die ohne Translokation des Ah-Rezeptors in den Nukleulus und ohne Bindung an XRE-Elemente die Aktivierung der Transkription zur Folge hat.

In späteren Versuchen konnte Masmoudi et al. 1997 zeigen, daß das UGT1A6 in der Leber der Ratte auf transkriptionaler Ebene von dem Schilddrüsenhormon L-T3 reguliert wird. Auch er postuliert unterschiedliche Mechanismen der Aktivierung. Methylcholanthren und L-T3 induzieren die mRNA des UGT1A6, wobei Methylcholanthren den bereits beschriebenen konventionellen Signaltransduktionsweg beschreitet. L-T3 hingegen benötigt eine *de novo* Proteinsynthese eines Faktors, der unbedingt zur Stimulierung der UGT1A6-Gentranskription benötigt wird. Nach Guéraud et al. 1997 üben auch Wachstumshormone Einfluß auf die differentielle Regulation des UGT1A-Genkomplexes auf posttranskriptionaler Ebene aus.

Diese Versuche zeigen, daß bisher die Induktion durch Methylcholanthren, andere PAH's und Hormone noch unvollständig verstanden ist und daß eine genauere Charakterisierung der beteiligten Mechanismen zum Verständnis der Gewebsspezifität der Induktionsvorgänge beitragen kann.

In dieser Arbeit konnte zwar gezeigt werden, daß Methylcholanthren in der Lage ist, die mRNA-Expression einzelner UGT1A-Isoenzyme im Gastrointestinaltrakt der Ratte zu induzieren, doch fallen die Induktionsfaktoren im Vergleich zur Leber deutlich geringer aus. Da anhand der gefundenen Ergebnisse in der Literatur bereits für die Leber verschiedene Induktionsmechanismen bestehen müssen, bleibt die Frage nach den Mechanismen der Signaltransduktion im Darm aber weiterhin offen. In diesem Zusammenhang könnte die Verfügbarkeit der Komponenten der PAH-abhängigen Signaltransduktion einen limitierenden Faktor darstellen. Wenn zum Beispiel Ah-Rezeptor und ARNT-Protein nicht in ausreichender Menge in den Darm- und Magen zellen exprimiert sind, hätte dies eine verminderte Induktion zur Folge. Eine erste Bestätigung dieser Theorie ist schon bei den P450 Cytochromen gefunden worden. In Untersuchungen zur Induktion von Cytochrom P450 1A1 mit β -Naphthoflavone (BNF) konnte Zhang et al. 1997 zeigen, daß die Induzierbarkeit vom Duodenum zum Ileum abnimmt und daß dieser Befund mit der Abnahme des Ah-Rezeptors korreliert.

Es ist bisher auch noch nicht geklärt worden, ob Ah-Rezeptor-ARNT-Komplexe nach Induktion überhaupt in der Mukosa des Darms und des Magens in den Nukleulus transportiert werden und fähig sind, an XRE-Elemente des Promotors zu binden. Mit welcher Effektivität die Bindung an das XRE-Element stattfindet und ob die Bindung des Ah-Rezeptor-ARNT-Komplexes an das XRE-Element und die Induktion mit der Bindung korreliert, wäre weiterhin klärungsbedürftig. Darüberhinaus könnte der Einfluß von Aktivatoren und Inhibitoren der

Proteinkinase C sowie Inhibitoren der Serin-Threonin Phosphoprotein-Phosphatasen weitere Hinweise auf die Regulation der Induktion geben.

Es ist bekannt, daß „Okadaic Acid“, eine Polyäther-Fettsäure, die Induktion durch Methylcholanthren für das Cytochrom P450 2A8 potenzieren kann (Tohkin et al. 1996). Es wäre daher sehr interessant zu prüfen, inwieweit Okadaic Acid bzw. Phorbol ester die Translokation des Ah-Rezeptors in den Zellkern beeinflussen oder ob sie dort über die AP-1 Bindungsstelle Ah-Rezeptor unabhängig tätig werden.

Bei Induktionsversuchen kann auch die Kinetik von großer Bedeutung sein. In Versuchen zur Regulation des Cytochroms P450 1A1 im Dünndarm und in der Leber der Ratte, konnte festgestellt werden, daß nach Induktion mit β -Naphthoflavone (BNF) die höchste Expression an mRNA in beiden Organen bereits nach sechs Stunden erreicht war und eine starke Abnahme der mRNA bis zu 12 Stunden nach Induktion zu beobachten war (Zhang et al. 1997). Um zu überprüfen, ob eine Änderung der Induktionsfaktoren auch bei den UGT1A-Isoenzymen nach 6 Stunden im Vergleich zu 24 Stunden stattfindet, wurden exemplarisch der Magen, das Duodenum, das Ileum, das Colon und die Leber nach 6 Stunden Methylcholanthren-Induktion untersucht. Für die untersuchten Organe konnte im Vergleich zum Cytochrom P450 1A1 jedoch kein signifikanter Unterschied für die UGT1A-Isoenzyme zwischen den beiden Zeitpunkten festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

4.3. Expression und Induktion des UGT1A1 und des UGT1A9

Zwei Organe wiesen bei der Betrachtung des UGT1A1 eine Besonderheit auf. Der Magen sowie das Duodenum zeigten eine große Variabilität im Induktionsverhalten der getesteten Tiere, wobei jedesmal dasselbe Tier mit sehr hohen Induktionsfaktoren nach Methylcholanthren-Behandlung herausfiel. Da die Ergebnisse nicht auf einem Fehler in der Methodik zurückzuführen sind, könnte dies ein Hinweis auf einen bestehenden Polymorphismus des UGT1A1 sein, wie er bereits für einzelne P450-Cytochrome bekannt ist (Gough et al. 1990).

Bereits in der RT-PCR sowie im Northern Blot konnte erstmals die Expression des Pseudogens UGT1A9 in der Leber nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß die Regulation zur Bildung der mRNA dieses Gens noch intakt ist. Um so überraschender war der Befund, daß auch eine Induktion des UGT1A9 durch Methylcholanthren in der Leber zu

beobachten war. Emi et al. 1995 konnte zeigen, daß die typischen XRE-Elemente in der Promotor-Region des UGT1A9 fehlen. Wie bereits diskutiert wurde, schließt das Fehlen sogenannter XRE-Elemente eine Induktion nicht unbedingt aus. Genügend Hinweise untermauern die Existenz anderer Aktivierungsmechanismen, die unabhängig von XRE-Elementen ablaufen scheinen. Es bestünde jedoch auch die Möglichkeit, daß die in den Northern Blot-Analysen verwendete Sonde zur Detektion des UGT1A9 mit einem bisher noch unbekanntem UGT1A-Isoenzym kreuzreagiert und somit die Induktionsergebnisse nicht das UGT1A9 betrifft, sondern eine neue Glukuronosyltransferase der UGT1A-Proteine. Die bisher bekannten unterschiedlichen UGT1A-Gene liegen alle hintereinander und bilden nur einen Genkomplex im Vergleich zu den UGT2-Genen, die auf Einzelgenen lokalisiert sind (s. **Abb. 35**). Die „letzte“ Glukuronosyltransferase in dieser Reihe ist das UGT1A9. Die sich davor befindliche Sequenz „stromaufwärts“ zum 5`-Ende ist noch nicht bekannt. Es wäre also durchaus möglich, daß sich stromaufwärts noch weitere UGT1A-Isoformen befinden, die bisher noch nicht entdeckt wurden.

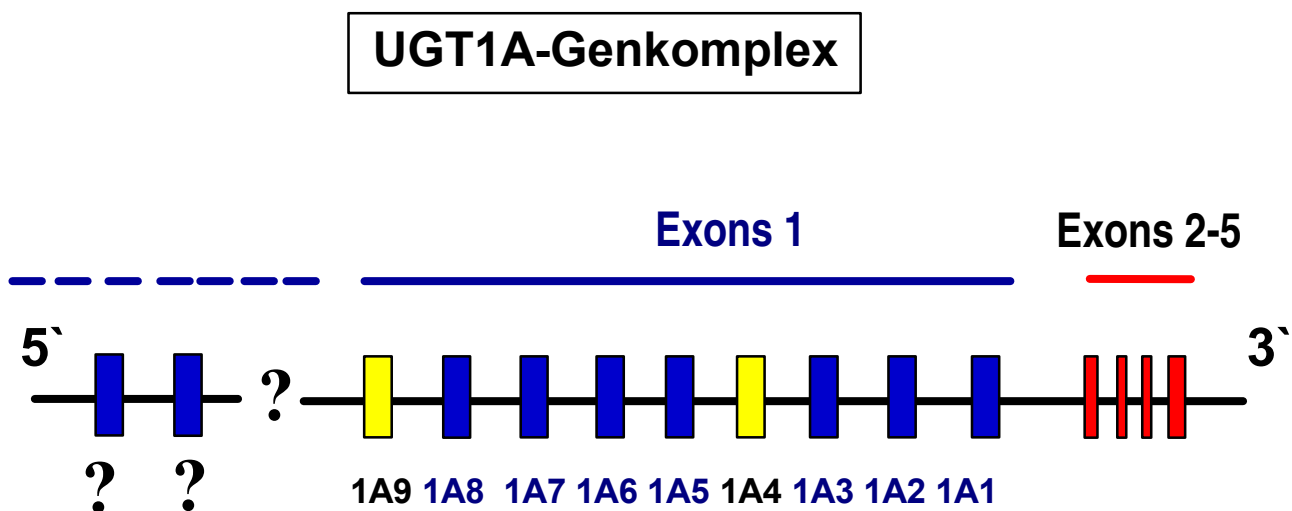


Abb. 35: Dargestellt ist die Organisation des UGT1A-Genkomplexes mit den bisher bekannten- und eventuell noch nicht entdeckten Isoenzymen.

4.4. Glukuronidierungsaktivität der UGT1A-Proteine

Da der Gastrointestinaltrakt ebenso wie die Leber über eine komplexe Ausstattung an Glukuronosyltransferasen verfügt, stellt auch der Darm ein aktives Organ zur extrahepatischen Glukuronidierung dar. Um festzustellen, wie effektiv jedoch die gastrointestinale Barriere Schadstoffe entgiften zu vermag, sollten erste Aktivitätsassays Hinweise zur Glukuronidierung geben. Dabei sollte die Frage geklärt werden, ob das gefundene Expressions- und Induktionsmuster der UGT1A-Proteine mit der Glukuronidierungsaktivität übereinstimmt.

Paranitrophenol gehört zur Gruppe der phenolischen Substrate und stellt einen klassischen Vertreter für die Glukuronidierung des UGT1A6 dar. Zwar konnten Mackenzie et al. 1990 beweisen, daß allein der N-Terminus von 298-Aminosäuren ausreichend für die Substratspezifität ist. Trotzdem besteht jedoch die Möglichkeit, daß ein Substrat von mehreren Glukuronosyltransferasen umgesetzt werden kann. Es findet also eine allgemeine „Substrat-Überlappung“ bei der Glukuronidierung statt. Es fiel zunächst auf, daß die UGT1A-Aktivität mit dem gefundenen RNA-Expressionsmuster nicht übereinstimmte. Auch dann nicht, wenn davon ausgegangen wird, daß Paranitrophenol hauptsächlich von UGT1A6 umgesetzt wird. Die höchste mRNA-Expression wurde im Duodenum gefunden, wohingegen die Mikrosomen des Duodenums uninduziert die schwächste Aktivität zeigen.

Nach Methylcholanthren-Behandlung war die UGT1A-Aktivität, bis auf das Colon, in allen untersuchten Organen erhöht. Aus früheren Untersuchungen geht hervor, daß die Entgiftungsaktivität im Intestinaltrakt erheblich geringer ist als in der Leber (Vainio et al. 1980 und Aitio et al. 1980). Den Erwartungen entsprechend war auch in der Leber mit Abstand die höchste Aktivität zu beobachten. Gefolgt von der Leber zeigten die Mikrosomen des Duodenums nach Methylcholanthren-Induktion immerhin noch eine Aktivitätssteigerung um das 12-fache. Absorptions-Studien mit Salicylamiden oder Morphinen haben ergeben, daß bezogen auf den gesamten Intestinaltrakt, allein im Duodenum bis zu 60% metabolisiert wird (Koster et al. 1982) und daß nach Induktion mit 1-Naphthol oder Morphinen vom Duodenum zu den proximalen Darmabschnitten eine Aktivitätsabnahme stattfindet (Koster et al. 1985). In Untersuchungen zur Glukuronidierung der Gallensäure konnten im Colon nur noch 30 % der Aktivität des Duodenum gefunden werden (Matern et al. 1984). Im Colon ist nach Methylcholanthren-Induktion für Paranitrophenol nicht nur eine drastische Abnahme der UGT1A-Aktivität zu erkennen, sondern sogar eine Reduktion.

Dieser Befund ist jedoch auch beim Menschen beobachtet worden. Humane Mikrosomen des Colons zeigen eine fast 100-fach schwächere Aktivität in der Umsetzung von phenolischen Substraten und auch dieses Ergebnis stand im Widerspruch zu den gefundenen Daten auf mRNA- und Protein-Ebene (Strassburg et al. 1999).

Um die Aktivität der UGT1A-Proteine besser charakterisieren zu können, sind weitere Untersuchungen mit verschiedenen Substanzgruppen, wie zum Beispiel Flavone, Steroide, polyzyklische Aromaten und Karzinogene notwendig. Im humanen Bereich sind erst kürzlich Aktivitäts-Untersuchungen an Mikrosomen der Leber und des Colons mit einem breiten Substratspektrum durchgeführt worden (Strassburg et al. 1999).

Die bisher gefundenen Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Glukuronidierungsaktivität der UGT1A-Proteine entweder durch die Expression individueller Isoformen mit unterschiedlicher katalytischer Aktivität oder durch Organ-spezifische Modulatoren nach der Genexpression reguliert wird. So wären posttranskriptionale Modifizierungen denkbar, die in der Mukosa des Darms Konformationsänderungen der Glukuronosyltransferasen verursachen und somit unmittelbar Einfluß auf ihre Aktivität nehmen könnten. Langkettige Fettsäuren besitzen die Fähigkeit, die Funktion der UGT's zu inhibieren (Zhong et al. 1991). In neueren Untersuchungen konnte genauer festgestellt werden, daß UGT-Proteine in der Lage sind, an Acyl-Coenzym-A gebundene langkettige Fettsäuren zu binden. Diese Bindung hat wiederum eine Konformationsänderung zur Folge und führt letztendlich zur Inhibierung der UGT-Aktivität (Yamashita et al. 1997).

Ferner wird die Funktion der Glukuronosyltransferasen stark von der Lipidzusammensetzung der Membran und vom Lipidmetabolismus beeinflusst, der sich im Colon physiologisch wesentlich vom Lipidmetabolismus der Leber unterscheidet. Ein zusätzlicher Ansatzpunkt könnte die Prozessierung der UGT-Proteine sein. Durch ihre Lokalisation in der inneren Membran des endoplasmatischen Reticulums (ER) sind die UGT-Proteine posttranslationalen Modifikationen ausgesetzt. Unterschiede in der Glykosylierung könnten konformationsabhängig unterschiedliche UGT-Proteine hervorbringen, die auf Grund dessen verschiedene katalytische Aktivitäten aufweisen (Singh et al. 1982).

Adams, J.D., Lee, S.J., Vinchkoski, N., Castonguay, A., Hoffman, D.,: On the formation of the tobacco specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone during smoking.

Cancer Lett. **Vol. 17** : 339-346 (1983)

Aitio, A.,: UDP-glucuronosyltransferase activity in various rat tissues.

Int. J. Biochem. **Vol. 5** : 325-330 (1974)

Aitio, A., and Marniemi, J. : Extrahepatic glukuronide conjugation.

In Extrahepatic Metabolism of Drug and Other Foreign Compounds (T.E. Gram, Ed.), pp. 365-387. S.P. Medical and Scientific Books, New York (1980)

Aono, S., Adachi, Y., Uyama, E., Yamada, Y., Keino, H., Nanno, T., Koiwai, O., and Sato, H.,: Analysis of genes for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in Gilberts-syndrome.

Lancet. **Vol. 345** : 958-959 (1995)

Birnboim, H.C., Doly, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Nucl. Acids Res. **7** : 1513-1523 (1979)

Black, M., and Sherlock, S.,: Treatment of Gilbert-Syndrome with phenobarbital.

Lancet, June 27 : 1359-1362 (1970)

Bock, K.W., Lilienblum, W., Fischer, G., Schirmer, G. and Bock-Hennig, B.S.,: The role of conjugation reactions in detoxification.

Arch. Toxicol. **60** : 22-29 (1987)

Bock, K.W.: Role of UDP-Glucuronosyltransferases in Chemical Carcinogenesis.

Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. **Vol. 26 (2)** : 129-150 (1991)

Bock, K.W.: UDP-Glucuronosyltransferases and Their Role in Metabolism and Disposition of Carcinogens.

Advances in Pharmacology. **Vol. 27** : 367-383 (1994)

Bock, K.W., Gschaidmeier, H., Seidel, A., Baird, S., and Burchell, B., : Mono- and diglucuronide formation from chrysene and benzo(a)pyrene phenols by 3-methylcholanthren-inducible phenol UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1).

Mol. Pharmacol. **Vol. 42** : 613-618 (1992)

Bock, K.W., Forster, A., Gschaidmeier, Brück, M., Münzel, P., Schareck, W., Fournel-Gigleu, S., and Burchell, B., : Paracetamol glukuronidation by recombinant rat and human phenol UDP-glucuronosyltransferases.

Biochem. Pharmacol. **Vol. 45** : 1809-1814 (1993)

Bosma, P.J., Chowdhury, N., Goldhoorn, B.G., Hofker, M.H., Oude Elfering, R.P.J., Jansen, P.L.M., and Roy Chowdhury,J.,: Sequence of exons and the flanking regions of human bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase gene complex and identification of a genetic mutation in a patient with Crigler-Najjar syndrome, type I.

Hepatology. **Vol. 15** : 941-947 (1992)

**Burchell,B., Nebert, D.W., Nelson, D.R., Bock, K.W., Iyanagi, T., Jansen, P.L.M., Lan-
cet, D., Mulder, G.J., Chowdhury, J.R., Siest, G., Tephly, T.R. und Mackenzie, P.I.,**:
The UDP-glucuronosyltransferase gene superfamily: suggested nomenclature based on evolutionary divergence.

DNA and Cell Biology 10 : 487-494 (1991)

Burchell, B., Coughtrie, M.W.H., and Jansen, P. L. M.,: Function and regulation of UDP-glucuronosyltransferase genes in health and liver disease: Report of the seventh international workshop on glucuronidation, September 1993, Pitlochry, Scotland.

Hepatology. **Vol. 20** : 1622-1630 (1994)

Burnette, W.N., : „Western blotting“ Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated Protein.

A. Anal. Biochem. **112** : 195-203 (1981)

Bradford, M.M.: A rapid and sensitiv method for the quantification of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem. **72** : 248-254 (1976)

Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stüber, D., Müller, M., Ibrahimi, I., Häuptle, M.T. and Dobberstein, B.: A T5 promotor based transcription-translation system for the analysis of protein in vivo and in vitro.

Methods in Enzymology **155** : 416-433 (1987)

Chen, Y.H., and Tukey, R.H.: Protein Kinase C Modulates Regulation of the CYP 1A1 Gene by the Aryl Hydrocarbon Receptor.

J. Biol. Chem. **Vol. 271** : 26261-26266 (1996)

Chowdhury, J.R., Wolkoff, A.W. and Arias I.M., : Hereditary jaundice and disorders of bilirubin metabolism.

Chapter 53, pp. 1367-1408

Chowdhury, J.R., Fischberg, E.B., Daniller, A., Jansen, P.L.M. and Arias, I.M.: Hepatic conversion of bilirubin monoglucuronide to bilirubin diglucuronide in uridine diphosphate glucuronoyl transferase.

J. Clin. Invest. **Vol. 21** : 191 (1978)

Chowdhury, J. R., Novikoff, P.M., Chowdhury, N.R. and Novikoff, A.B.: Distribution of UDPglucuronosyltransferase in rat tissue.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **Vol. 82** : 2290-2994 (1985)

Chowdhury, J. R., Chowdhury, N.R., Wolfkoff, A.W. and Arias, J.W.:Heme and bile pigment metabolism, in *The Liver: Biology and Pathobiology* (Arias, I. M., Boyer, J.L., Fausto, W.B., Jakoby, D.A., Schachter, D.A. and Schafnitz, D.A. eds) pp. 471-504, Raven Press, New York. (1994)

Church, G.M., and Gilbert, W., : Genomic sequencing.
PNAS, USA. **81** : 1991-1995 (1984)

Cirvelli, O., Lavarini, C., Chiaberge, E., Amoroso, A., Farci, P., Negro, F., Rizzetto, M.: Microsomal autoantibodies in chronic infection with the Hbs-Ag-associated delta agent.
Clin. Exp. Immunol. **54** : 232-238 (1983)

Coughtrie, M.W.H., Burchell, B, B., Shepherd, I.M., and Bend, J.R.: Defective induction of phenol glucuronidation by 3-methylcholanthrene in Gunn rats is due to the absence of a specific UDP-glucuronosyltransferase isoenzyme.
Mol. Pharmacol. **Vol. 31** : 585-591 (1987)

Dubey, R.K., and Singh, J.: Localisation and characterisation of drug-metabolizing enzymes along the villus-crypt surface of the rat small intestine-II.
Biochem. Pharmacol. **Vol. 37** : 177-184 (1988)

Dutton, G.J.: Glucuronidation of drugs and other compounds.
pp. 3-268, Boca Raton, Florida : CRC Press. (1980)

Ebner, T., Rimmel, R.P., and Burchell, B.: Human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase catalyzes the glucuronidation of ethinylestradiol.
Mol. Pharmacol. **Vol. 43** : 649-654 (1993)

Ebner, T., and Burchell, B.: Substrate specificities of two stable expressed human liver UDP-glucuronosyltransferases of the UGT1 gene family.
Drug Metabolism and Disposition. **Vol. 21** : 50-55 (1993)

EIAwady, M., Chowdhury, J.R., Kesari, K., van Es, H.,: Mechanism of the Lack of Induction of UDP-glucuronosyltransferase Activity in Gunn Rats by 3-Methylcholanthrene. Identification of a truncated enzyme.

J. Biological Chemistry **Vol. 265**, No. 18 : 10752-10758 (1990)

Emi, Y., and Omura T., : Synthesis of Sex-Specific Forms of Cytochrom P-450 in Rat Liver is Transiently Suppressed by Hepatic Monooxygenase Inducers.

J. Biochem. **Vol. 104** : 40-43 (1988)

Emi, Yoshikazu., Ikushiro, Shin-ichi., and Iyanagi, Takashi.: Drug-Responsive and Tissue-Specific Alternative Expression of Multiple First Exons in Rat UDP-Glucuronosyltransferase Family 1 (UGT1) Gene Complex.

J. Biochem. **117** : 392-399 (1995)

Emi, Y., Ikushiro, S., Iyanagi, T., : Xenobiotic response element-mediated activation in the UDP-glucuronosyltransferase family 1 gene complex.

J. Biol. Chem. **Vol. 271** : 3952-3958 (1996)

Enan, E., Matsumura, F.,: Evidence for a second pathway in the action mechanism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD).

Biochem. Pharmacol. **Vol. 49** : 249-261, 1995

Falany, C.N. and Tephly, T.R.,: Separation and characterization of three isoenzymes of UDP-glucuronosyltransferase from rat liver microsomes.

Arch. Biochem. Biophys. **Vol. 227** : 248-258 (1983)

Feinberg, A.P., and Vogelstein, B., A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.

Anal. Biochem. **132** : 6-13 (1983)

Feinberg, A.P., and Vogelstein, B., Addendum : A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.

Anal. Biochem. **137** : 266-267 (1984)

Felton, J.S., Knize, M.G.: Occurrence, identification and bacterial mutagenicity of heterocyclic amines in cooked food.

Mutat. Res, **Vol. 259** : 205-217 (1991)

Fort, P., Marty, L., Piechaczyk M., el Sabrouy S., Dani, C., Jeanteur, P., and Blanchard, J.M.: Varius rat adult tissue express only one major mRNA species from Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Nucleic. Acids. Res. **13** : 1431-1442 (1985)

Goon, D., Claasen, CD.: Effects of microsomal enzyminducers upon UDP-glucuronyltransferase activity in the rat intestine and liver.

Toxicol. Appl. Pharmacol. **115** : 253-260 (1992)

Gough, A.C., Miles, J.S., Spurr, N.K., Moss, J.E., Gaedigk, A., Eichelbaum, M., and Wolf, R.: Identification of the primary gene defect at the cytochrome P450 CYP2D locus.

Nature. **Vol. 347** : 773-776 (1990)

Green, M.D., and Tephly, T.R.: Glucuronidation of amines and hydroxilated xenobiotics and endobiotics catalyzed by expressed human UGT1.4 protein.

Drug Metabol. Dispos. **Vol. 24** : 456-363 (1996)

Grove, A.D., Kessler, F.K., Metz, R.P. and Ritter, J.F.: Identifikation of a Rat Oltipraz-inducible UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A7) with Activity Towards Benzo (α)pyrene-7,8-dihydrodiol.

J. Biol.Chem. **Vol. 272** : 1621-1627 (1997)

Guengerich, F.P.: Roles of the cytochrome P450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy.

Cancer. Res. **Vol. 48** : 2946-2954 (1988)

Guéraud, F., Masmoudi, T., Goudonnet, H., and Paris, A.,: Differential Effect of Hypophysectomy and Groth Hormone Treatment on Hepatic Glucuronosyltransferases in Male Rats: Evidence for an Action at a Pretranslational Level for Isoform Glucuronodating Bilirubin.

Biochem. Pharmacol. **Vol. 53** : 1637-1647 (1997)

Hänninen, O., Aitio, A. and Hartiala, K., :Gastrointestinal distribution of glucuronide synthesis and the relevant enzymes in the rat.

Scand. J. Gastroenterol. **3** : 461-464 (1968)

Harada, N., and Omura, T.,: Selective Induction of Two Different Molecular Species of Cytochrome P-450 by Phenobarbital and 3-Methylcholanthrene.

J. Biochem. **Vol. 89** : 237-248 (1981)

Hartiala, K.J.W., Pulkkinen, M.O. and Savola, P. : β -D-Glucosiduronic acid conjugation by the mucosa of various organs.

Nature (London). **Vol. 201** : 1036 (1964)

Hauser, S.C., Ziurys, J.C., and Gollan, J.L.: A membran transporter mediates access of uridine 5'-diphosphoglucuronic acid from the cytosol into the endoplasmatic reticulum of rat hepatocytes: implication for glucuronidation reactions.

Biochem. Biophys. Acta, Vol. 967 : 149 (1988)

Hoffman, D., Rivenson, A., Chung, F.L., Hecht, S.S.,: Nicotine derived N-nitrosoamines (TSNA) and their relevance in tobacco carcinogenesis.

Crit. Rev. Toxicol, **Vol. 21** : 305-311 (1991)

Hu, Z., Well, P.G.,: In vitro and in vivo biotransformation and covalent binding of benzo(a)pyrene in Gunn and RHA rats with a genetic deficiency in bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase.

J. Pharmacol. Exp. Ther. **Vol. 263** : 334-342 (1992)

Ikushiro, Shin-ichi., Emi, Yoshikazu., and Iyanagi, Takashi.: Identification and Analysis of Drug-Responsive Expression of UDP-Glucuronosyltransferase Family 1 (UGT1) Isoenzyme in Rat Hepatic Microsomes Using Anti-peptide Antibodies.

Arch. Biochem. And Biophys. Vol. 324 : 267-272 (1995)

Iyanagi, T., Haniu, M., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y., Watanabe, S., Shively, J.E., and Anan, K.F.: Cloning and characterization of cDNA encoding 3-methylcholanthren inducible rat mRNA for UDP-Glucuronosyltransferases.

J. Biol. Chem. Vol. 261 : 15607 (1986)

Iyanagi, T.: Molecular Basis of Multiple UDP-Glucuronosyltransferase Isoenzyme Deficiencies in the Hyperbilirubinemic Rat (Gunn Rat).

J. Biological Chemistry. Vol 266 , No. 35 : 24048-24052 (1991)

Iyanagi, T., Watanabe, T. and Uchijama, Y.: The 3-Methylcholanthrene-inducible UDP-glucuronosyltransferase Deficiency in the Hyperbilirubinemic Rat (Gunn Rat) Is Caused by a -1 Frameshift Mutation.

J. Biological Chemistry. Vol 264 , No. 35 : 21302-21307 (1989)

Jansen, P.L.M., Mulder, G.J., Burchell, B., and Bock, K.W.: New developments in glucuronidation research: Report of a workshop on „Glucuronodation, its Role in Health and Disease“.

Hepatology. Vol.15: 532-544 (1992)

Jaffe, B.M., Burgos, A.A. and Martinez-Noack, M.: The Use of Jejunal Transplants to Treat a Genetic Enzyme Deficiency

Annals of Surgery. Vol. 223, No.6 : 649-657 (1996)

Kadlubar, F.F.: Carcinogenic aromatic amine metabolism and DNA adduct detection in humans. Seite: 339-359. In Ernster, L., Esumi, H., Fujii, Z., Gelboin, H.V., Kato, R., Sugimura, T., (Hrsg.) Xenobiotics and Cancer: Implications for chemical carcinogenesis and Cancer Chemotherapy. Japan Scientific press, Tokyo (1991)

Kim, P.M., Winn, L.M., Parman, T., and Wells, P.G.: UDP-glucuronosyltransferase-mediated protection against in vitro DNA oxidation and micronodulus formation initiated by phenytoin and its embryotoxic metabolite 5-(p-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin.

J. Pharmacol. Exper. Ther. **Vol. 280** : 200-209 (1997)

Koster, A. S.J., and Noordhoek, J.: Glucuronidation in the rat intestinal wall. Comparison of isolated mucosa cells, latent microsomes and activated microsomes.

Biochem. Pharmacol. **Vol. 32** : 895-900 (1983)

Koster, A. S.J., Frankhuijzen-Sierevogel, A.C., and Noordhoek, J.: Distribution of Glucuronidation Capacity (1-Naphthol and Morphine) along the Rat Intestine.

Biochem. Pharmacol. **Vol. 34** : 3527-3532 (1985)

Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature **227** : 680-685 (1970)

Lamp, J.G., Straub, P., and Tukey, R.H. : Cloning and Characterisation of cDNAs Encoding Mouse and Rabbit UGT 1.6: Differential induction of UGT1.6 by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin.

Biochemistry. **Vol.33** : 10513-10520 (1994)

LaVeccia, C., D'Avanzo, B., Airoidi, L., Braga, C., and Decarli, A.: Nitrosamine intake and gastric cancer risk.

Eur. J. Can. Prev. **Vol.4** : 469-474 (1995)

Lazard, D., Zupko, K., Poria, Y., Nef, P., Lazarovits, J., Horn, S., Khen, M., and Lancet, D.: Odorant signal termination by olfactory UDP-glucuronosyltransferase.

Nature. **Vol. 349** : 790-793 (1991)

Lilienblum, W., Walli, A.K. and Bock, K.W.: Differential induction of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities by various inducing agents.

Biochem. Pharmacol. **Vol. 31** : 907-913 (1982)

Lubet, R.A., Dragnev, K.H., Chauhan, D.P., et al.: A pleiotrophic response to phenobarbital-type enzyme inducers in the F344/NCr rat.

Biochem. Pharmacol. **43** : 1067-1078 (1992)

Mackenzie, P.: Expression of Chimeric cDNA in Cell Culture Defines a Region of UDP Glukuronosyltransferase Involved in Substrate Selection.

J. Biolol. Chem. **Vol. 265** : 3432-3435 (1990)

Mackenzie, P.I., Owenes, I.S., Burchell, B., Bock, K.W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D.W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Roy Chodhury, J., Ritter, J.K., Schachter, H., Tephly, T.R., Tipton, K.F., and Nebert, D.W.: The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommened nomenclatureupdate based on evolutionary divergence.

Pharmacogenetics, **Vol. 7** : 255-269 (1997)

Manabe, S., Tohyama, K., Wada, O., Aramaki, T.: Detection of a carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol (4,5-b) pyridine (PhIP), in cigarette smoke condensate.

Carcinogenesis, **Vol.12** : 1945-1947 (1991)

Manabe, S., Suzuki, H., Wada, O., Ueki, A.: Detection of a carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol (4,5-b) pyridine (PhIP), in beer and wine.

Carcinogenesis, **Vol.14** : 899-901 (1993)

Masmoudi, T., Planells, R., Mounié, J., Arthus, Y., Magdalou, J., and Goudonnet, H.: Opposite regulation of bilirubin and 4-nitrophenol UDP-glucuronosyltransferase mRNA levels by 3,3',5 triiodo-L-thyronine in rat liver.

FEBS Letters. **Vol. 379** : 181-185 (1996)

Masmoudi, T., Hihi, A.K., Vázquez, M., Artur, Y., Desvergne, B., Wahli, W., and Goudonnet, H.: Transcriptional Regulation by Triiodothyronine of the UDP-glukuronosyltransferase Family 1 Gene Complex in Rat Liver. Comperasion with induction by 3-methylcholanthrene.

J. Biol. Chem. **Vol. 272** : 17171-17175 (1997)

Matern, S., Matern, H., Fathmann, E.H., and Gerok, W., : Hepatic and Extrahepatic Glucuronidation of Bile Acids in Man. Characterisation of Bile Acid Uridine 5'-Diphosphate-Glucuronosyltransferase in Hepatic, Renal, and Intestinal Microsomes.

J. Clin. Invest. **Vol. 74** : 402-410 (1984)

Meyer, T.S.; Lamberts, B.L.: Use of Coomassie brilliant blue R250 for the elektrophoresis of microgramm quantities of parotid salvia protein on acrylamid gel strips.

Biophys. Acta **107** : 144-145 (1965)

Milla, M.E., Clairmont, C.A., and Hirschberg, C.B.: Reconstitution into proteoliposomes and partial purification of the golgi apparatus membrane UDP-galactose, UDP-xylose and UDP-glucuronic acid transport activities.

J. biol. Chem, **Vol. 276** : 103-107 (1992)

Miller, E.C., and Miller, J.A.: Searches of ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules.

Cancer. **Vol. 47** : 2327 (1981)

Miller, A., and Miller, E.C.: Electrophilic sulfuric acid ester metabolites sa ultimate carcinogens, in Biological Reactive Intermediates III;

Advances in Experimental Medicine and Biology. **Vol. 197** : 583 (1986)

Moghrabi, N., Clarke, D.J., Boxer, M., Burchell, B.: identification of an A-to-G missens mutation in exon 2 of the UGT1 gene complex that causes Crigler-Najjar Syndrome type 2.

Genomics. **Vol. 18** : 171-173 (1993)

Mojarrabi, B., Butler, R., and Mackenzie, P.I.: cDNA cloning and characterization of the human UDP-Glucuronosyltransferase, UGT1A3.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **Vol. 225** : 785-790 (1996)

Münzel, P.A., Brück, M., Bock, K.W.: Tissue specific constitutive and inducible expression of rat phenol UDP-gliukuronosyltransferase.

Biochem. Pharmacol. **Vol. 47** : 1445-1448 (1994)

Münzel, P.A., Lehmkoetter, T., Brück, M., Ritter, J.K., and Bock, K.W.: Aryl hydrocarbon receptor-inducible or constitutive expression of human UDP glucuronosyltransferase UGT1A6.

Arch. Biochem. Biophys. **Vol. 350** : 72-78 (1998)

Mullis, K., and Faloona, F.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction.

Meth Enzymol. **Vol. 55** : 335-350 (1987)

Ohgaki, H., Takayama, S., Sugimura, T.: Carcinogenicities of heterocyclic amines in cooked food.

Mutat. Res, **Vol. 259** : 399-410 (1991)

Osborne, M.R., and Crosby, N.T.: Benzo(a)pyrene. Seite: 198-221

Cambridge University Press, Cambridge England (1987)

Ouzzine, M., Pillot, T., Fournel-Gigleux, S., Magdalou, J., Burchell, B., and Siest, G.: Expression and role of the human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT 1*6 analyzed by specific antibodies raised against a hybrid protein produced in Escherichia coli.

Arch. Biochem. Biophys. **Vol. 310** : 196- 204 (1994)

Owens, I.S., and Ritter, J.K. : Gene Structure at the Human UGT1 Locus Creates Diversity in Isoenzyme Structure, Substrate Specificity, and Regulation.

Section on Genetic Disorders of Drug Metabolism.

Prog Nucleic Acids Res. **Vol. 51** : 305-338 (1995)

Parke, D.V., Ioannides, C., and Lewis, D.F.V.: The role of cytochrom P450 in the detoxification and activation of drugs and other chemicals.

J. Physiol. Pharmacol. **Vol. 69** : 537-549 (1991)

Quattrochi, L.C., Vu, T., and Tukey, R.H. : The human CYP 1A2 gene induction by 3-methylcholanthrene.

J. Bio. Chem. **Vol. 269** : 6949-6954 (1994)

Raval, P., Iversen, P.L., and Bresnick, E., : Induction of cytochrom P450 1A1 and P450 1A2 as determined by solution Hybridization.

Biochem. Pharmacol. **Vol. 41** : 1719-1723 (1990)

Ritter, J.K., Chen, F., Sheen, Y.Y., Tran, H.M., Kimura, S., Yeatman, M.T., and Owens, I.S., : A Novel Complex Locus UGT1 Encodes Human Bilirubin, Phenol, and Other UDP-Glucuronosyltransferase Isoenzymes with Identical Carboxyl Termini.

J. Biol. Chem. **Vol. 267**, No. 5 : 3257-3261 (1992)

Ritter, J.K., Yeatman, M.T., Ferreira, P., and Owens, I. S., : Identification of genetic alteration in the code for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in the UGT1 gene complex of a Crigler-Najjar type I patient.

J. Clin. Invest. **Vol. 90** : 150-155 (1992)

Ritter, J.K., Yeatman, Kaiser, C., Gridelli, B., and Owens, I. S.,: A Phenylalanin Codon Deletion at the UGT1 Gene Complex Locus of a Crigler-Najjar Type-I Patient Generates a pH-sensitive Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase.

J. Biol. Chem. **Vol. 268** : 23573-23579 (1993)

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A., : Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.

Science. **239** : 487-491 (1988)

Sanger, F., Nickler, S. and Coulson, A.R. : DANN sequencing with chain terminating inhibitors.

Proc.Natl. Acad. Sci. USA **74** : 5463-5467 (1977)

Sato, H., Koiwai, O., Tanabe, K., and Kashiwamata, S.,: Isolation and sequencing of rat liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNA: Possible alternate splicing of a common primary transcript.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **Vol. 169** : 260-264 (1990)

Seppen, J., Bosma, P.J., Goldhoorn, B.G., Bakker, C.T., Chowdhury, J.R., Chowdhury, N.R., Jansen, P.L. and Oude Elferink, R.P.: Discrimination between Crigler-Najjar syndrome type I and II by expression of mutant bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase.

J. Clin. Invest. **Vol. 94** : 2385-2391 (1994)

Singh, O.M.P., Graham, A.B., and Wood, G.C.: The phospholipid dependence of UDP-glucuronosyltransferase: conformation/reactivity studies with purified enzyme.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **Vol. 107** : 345-349 (1982)

Strassburg, C.P., Obermayer-Straub, P., Alex, B., Durazzo, M., Rizzetto, M., Tukey, R.H., Manns, M.P. : Autoantibodies Against Glucuronosyltransferases Differ Between Viral Hepatitis and Autoimmune Hepatitis.

Gastroenterology, **Vol.111**, : 1576-1586 (1996)

Strassburg, C.P., Oldhafer, K., Manns, M.P. and Tukey, R.H. : Differential Expression of the UGT1A Locus in Human Liver, Biliary, and Gastric Tissue: Identification of UGT1A7 and UGT1A10 Transcripts in Extrahepatic Tissue.

Molecular Pharmacology, **Vol. 52** : 212- 220 (1997)

Strassburg, C.P., Manns, M.P. and Tukey, R.H. : Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A Locus in Human Colon.

J. Biological Chemistry. **Vol. 273**, No. 15 : 8719-8726 (1998)

Strassburg, C.P., Nguyen, N., Manns, M.P. and Tukey, R.H. : UDP-glucuronosyltransferase Activity in Human Liver and Colon.

Gastroenterologie. **Vol. 116** : 149-160 (1999)

Stüber, D., Matile, H. and Garotta, G.: System for high-level production in Escherichia coli and rapid purification of Recombinant Proteins: Application to Epitope Mapping, Preparation of Antibodies and Structure-Function Analysis.

In „ immunological Methods“ (I. Lefkovits and B. Pernis eds.) **Vol. IV** : 121-152 (1990)

Sugimura, T.,: Carcinogenicity of mutagenic heterocyclic amines formed during the cooking process.

Mutat. Res, **Vol.150** : 33-41 (1985)

Sutcliffe, J.G.: Complete nucleotide sequence of E. coli plasmid pBR322.

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **43** : 77-90 (1979)

Tanaka, T., Barnes, W.S., Williams, G.M., Weisburger, J.H.,: Multipotential carcinogenicity of the fried food mutagen 2-amino-3-methylimidazol(4,5-f)quinoline in rats.

Carcinogenesis, **Vol. 6** : 1043-1048 (1985)

Tephly, T.R., and Burchell, B.,: UDP-glucuronosyltransferase: a family of detoxifying enzymes.

TIPS. **Vol. 11** : 276-279 (1990)

Thein, S.L., and Wallace, R.B., : The use of synthetic oligonucleotide as specific hybridation probes in the diagnosis of genetic disorders.

In: Human genetic diseases : a practical approach (editor Davies, K.E.) 33-50. IRL Press, Herndon Virginia (1986)

Thorgeirsson, U.P., Dalgard, D.W., Reeves, J., and Adamson, R.H.,: Tumor incidence in a chemical carcinogenesis study of nonhuman primates.

Reg. Toxicol. Pharmacol. **Vol. 19** : 130-151 (1994)

Thornton, J.M., and Sibanda, B.L. : Human recombinant Interferon- γ is expressed as an inclusion body in E. coli cells.

J. Mol. Biol. **167** : 443-460 (1983)

Tohkin, M., Kurose, K., and Fukuhara, M.,: Okadaic acid potentiates 3-methylcholanthrene-induced CYP 2A8 gene expression. Involvement of activator protein-1.

Mol. Pharmacol. **Vol. 50** : 556-564 (1996)

Tukey, R. H., and Johnson, E.F.: Molecular aspects of the drug-metabolizing enzymes. In: W. Pratt und P. Taylor (Hrsg.), Principles of Drug Action. New York: Churchill Livingstone, Inc. pp. 423-468 (1990)

Vaino, H., and Hietanen, E.: in Concepts in Drug Metabolism (Eds. P. Jenner and B. Testa), part A, p. 251. Marcel Dekker, New York (1980)

Vanstapel, F., and Blanckaert, N.: Topology and regulation of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in sealed native microsomes from rat liver. Arch. Biochem. Biophys., **Vol. 263** : 216 (1988)

Wheater, P.R., Burkitt, H.G., and Daniels, V.G., : Funktionelle Histologie, Lehrbuch und Atlas Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore (1987)

Whitelock, J.P., Okino, S.T., Dong, L., Ko, H.P., Clarke-Katzenberg, R., Ma, Q., and Li, H.: Induction of cytochrome P4501A1 : a model for analysing mammalian gene transcription. FASEB J. **Vol. 10** :809-818 (1996)

Wiesman, R.W., Stowers, S.T., Miller, E.C., Anderson, M.W., and Miller, J.A.: Activating mutations of the c-Ha-ras protooncogene in chemically induced hepatomas of the male B6C3F₁ mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **Vol. 83** : 5825 (1986)

Yabusaki, Y., Shimizu, M., Murakami, H., Nakamura, K., Oeda K., and Ohkawa H., : Nucleotide sequence of a full-length cDNA coding for 3-methylcholanthrene-induced rat liver cytochrom P-450MC. Nucleic Acids Research. **Vol. 12** , No.6 : 2929-2938 (1984)a

Yabusaki, Y., M., Murakami, Nakamura, K., Nomura, N., Y., Shimizu, Oeda K., and Ohkawa H., : Charakterisation of Complementary DNA Clones Coding for Two Forms of 3-Methylcholanthrene-Inducible Rat Liver Cytochrome P-450.

J. Biochem. Vol. 96 : 793-804 (1984)b

Yamashita, A., Nagatsuka, T., Watanabe, M., Kondo, H., Sugiura, T., and Waku, K.: Inhibition of UDP-glucuronosyltransferase activity by fatty acyl-CoA. Kinetic studies and structure-function relationship.

Biochem. Pharmacol. Vol. 53 : 561-570 (1997)

Zakim, D., Cantor, M., and Eible, H.: Phospholipids and UDP-glucuronosyltransferase. Structure / funktion relationships.

J. Biol. Chem. Vol. 263 : 5164-5169 (1988)

Zhang, Q.Y., Wikoff, J., Dunbar, D., and Kaminsky, L., : Charakterisation of rat small intestinal cytochrome P450 composition and inducibility.

Drug Metabolism and Disposition. Vol. 24 : 322-328 (1995)

Zhang, Q.Y., Wikoff, J., Dunbar, D., Fasco, M., and Kaminsky, L., : Regulation of cytochrom P450 1A1 Expression in rat small intestine.

Drug Metabolism and Disposition. Vol. 25 : 21-26 (1997)

Zhong, Z., Kauffman, and F.C., Thurman, R.G., : Inhibition of glucuronidation of benzo (α)pyrene phenols by long-chain fatty acids.

Cancer. Res. Vol. 51 : 4511-4515 (1991)

Publikationsliste

Examination of the mononuclear phagocyte system in lupus prone male BXSB mice.

Vieten-G; **Grams-B**; Müller-M, Hartung-K; Emmendorffer-A

J-Leukoc-Biol. 1996 Mar; 59 (3) : 325-32.

Distribution and inducibility by 3-methylcholanthrene of family 1 UDP-Glucuronosyltransferases in the rat gastrointestinal tract.

Bärbel Grams; Andrea Harms, Sabine Braun, Christian Strassburg, Michael P. Manns and Petra Obermayer-Straub

(submitted)

Danksagung

Prof. Dr. M.P. Manns danke ich für die Überlassung des Themas und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in der Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD. Dr. W. Müller, der mich bei allen Problemen intensiv betreut hat und entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Außerdem möchte ich Andrea Harms und Sabine Braun für die tatkräftige Unterstützung danken, sowie allen Mitarbeitern der Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie für das freundliche Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Tilman Winkler und Iris Dallman bedanken, die mir während der gesamten Zeit, in allen Lebenslagen jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen und einen wesentlichen Anteil an dieser Arbeit mittragen.

Lebenslauf:

Name: Bärbel Grams
Geburtstag: 4. Februar 1968
Geburtsort: Hannover-Kirchrode

Schulausbildung:

1974 - 1978: Grundschule Osterberg in Garbsen
1978 - 1980: Orientierungsstufe in Garbsen
1980 - 1987: Gymnasiums Garbsen (heutiger Name: Johannes Kepler Gymnasium)
Allgemeine Hochschulreife

Studium:

1987 - 1988: Lehramt für Grund- und Hauptschulen an der Technischen Universität in Braunschweig
1988 - 1989: Studienwechsel zum Lehramt für Realschulen an der Universität in Hannover
1989 - 1990: Studienwechsel zum Höheren Lehramt an der Universität in Hannover mit der Fächerkombination: Biologie und Chemie
1990 - 1995: Wechsel zum Diplomstudiengang Biologie an der Universität in Hannover
1993 - 1995: Anfertigung der Diplomarbeit am Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung in Hannover in der Abteilung Immunologie bei Prof. Marie Luise Lohmann-Matthes
1995 - 1999: wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Medizinische Hochschule Hannover bei Prof. Dr. Manns im Zentrum für Innere Medizin, Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie, Promotion.

Zusatzausbildung:

- 1988:** Ausbildung zur Schwestern-Helferin mit anschließendem 4-wöchigen Praktikum im Braunschweiger-Klinikum auf einer "Inneren Station"
- 1989 -1996:** Arbeitsvertrag im Krankenhaus Neu Bestesda in Hannover-Kirchrode (Henrieten-Stiftung)
Hauptsächliche Einsatzbereiche in der:
Neurologie bei Prof. Haferkamp
Gastroenterologie bei Prof. Spech
- 1990 -1996:** klassische Gesangausbildung bei Prof. Spaett an der Hochschule für Musik in Hamburg