

**Untersuchung der zytoprotektiven Funktion
humaner UDP-Glukuronosyltransferasen (UGT)
im Zellkulturmodell**

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

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Humanbiologin Juliane Topp
geboren am 09.06.1966 in Höxter

Hannover, 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 1998 bis April 2001 im Zentrum für Innere Medizin, Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie unter der Leitung von Prof. Dr. M. P. Manns angefertigt.

Referent: Prof. Dr. rer. nat. W. H. Müller

Koreferent: PD Dr. med. C. P. Strassburg

Tag der Promotion: 18.05.2001

Datum der Veröffentlichung: Dezember 2001

ZUSAMMENFASSUNG, ABSTRACT

ZUSAMMENFASSUNG

Der Kontakt unseres Körpers mit potentiell schädigenden endogenen und exogenen Substanzen wie Hormonen, Bilirubin, Nahrungsbestandteilen, Mutagenen und pharmakologischen Therapeutika erfordert effiziente Mechanismen, um diese Substanzen zu entgiften und aus dem Körper zu eliminieren. Eines der wichtigsten Detoxifikationssysteme des Phase II-Stoffwechsels bildet die Familie der UDP-Glukuronosyltransferasen (UGT), die lipophilen Substanzen einen polaren Glukuronsäurerest überträgt. Die dadurch gebildeten Glukuronide (β -D-Glukopyranosidonsäuren) sind hydrophiler als die Ausgangssubstrate und können leichter über die Galle oder mit dem Urin aus dem Körper ausgeschieden werden.

Basierend auf Aminosäuresequenzvergleichen wird die *UGT*-Supergenfamilie in zwei Subfamilien gegliedert, die *UGT1A*-Familie und die *UGT2*-Familie, die ihrerseits nochmal in *UGT2A* und *UGT2B* aufgeteilt ist. Zu der *UGT1A*-Familie gehören neun funktionelle Isoformen. Während die Expression der Mitglieder dieser Familie in der Leber konstant ist, variiert ihre Expression sowohl zwischen einzelnen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts als auch zwischen verschiedenen Individuen. Studien haben gezeigt, dass die Expression einzelner *UGT1A*-Gene bei Patienten mit Karzinomen der Leber, des Magens oder des Gallensystems differentiell herabreguliert wird und zu einer signifikanten Reduktion der mikrosomalen Mutagenentgiftung führt. Basierend auf diesen Befunden werden UGT als Risikofaktor der chemischen Karzinogenese postuliert, wobei dieser Zusammenhang bislang nicht direkt gezeigt wurde.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung zytoprotektiver Eigenschaften humaner *UGT1A*-Proteine. Dazu wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK-293) stabil mit individuellen *UGT1A*-cDNAs transfiziert und mit typischen humanen Karzinogenen (heterozyklische Amine und heterozyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) behandelt und die Wirkung der *UGT*-Expression auf Zytotoxizität, Proliferation und Apoptose untersucht.

Dieser Ansatz demonstriert erstmalig einen direkten zytoprotektiven Effekt von UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A7, UGT1A9 und UGT1A10 in Zellen, die dem Karzinogen 2-Amino-1-methyl-6-phenyl-1-H-imidazo[4,5-b]pyridin (PhIP) ausgesetzt waren, das durch hohes Erhitzen von Fleisch gebildet und über die Nahrung aufgenommen wird. Für 2-Amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxalin (MeIQX), ein weiteres Nahrungsmittelkarzinogen wurde eine Protektion durch UGT1A4 gezeigt und für das Karzinogen 7-Hydroxy-2-acetylaminofluoren (7-OH-AAF) eine Protektion durch UGT1A3. Die Analyse des Apoptoseverhaltens zeigte eine Zunahme bei Benzo(α)pyren-behandelten Zellen, aber im Gegensatz dazu keine Apoptoseinduktion durch PhIP-Exposition. Ebenso zeigte sich eine Reduktion der Proliferation Benzo(α)pyren-exponierter Zellen, während PhIP-Exposition nicht zur Änderung des Proliferationsverhaltens führte. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Zytoprotektion durch UGT bei der PhIP-Exposition, da geschädigte und potenziell initiierte Zellen nicht sterben, sondern mit der erworbenen Alteration weitere mitotische Zellzyklen vollziehen.

Die in dieser Arbeit entwickelten Zytoprotektionsexperimente belegen *in vitro* eine zytoprotektive Funktion einzelner UGT-Proteine und unterstreichen damit die Bedeutung dieser Gen-Superfamilie als Risikofaktorgene bei der Entstehung chemisch induzierter Tumoren.

Schlüsselwörter

- UDP-Glukuronosyltransferasen (UGT)
- Zytoprotektion
- Chemische Karzinogenese

ABSTRACT

The body's contact with multiple potentially harmful endogenous and exogenous substances such as hormones, bilirubin, food-borne drugs, mutagens, and pharmacological drugs requires efficient mechanisms capable of eliminating substances from the body. This process prevents cellular damage. One of the most important phase II detoxification systems represents the family of UDP-glucuronosyltransferases (UGT). UGT transfer a polar glucuronic acid moiety to lipophilic compounds, rendering the resulting glucuronides (β -D-glycopyranosiduronic acid) more hydrophilic and thereby facilitating their biliary or renal elimination.

Based upon amino acid sequence comparisons, of the *UGT* supergene family is divided into two subfamilies, family *UGT1A* and family *UGT2* with is further divided into *UGT2A* and *UGT2B*. The *UGT1A* family consists of 9 functional isoforms. The expression of family *UGT1A* members in human liver is constant, however their expression in the gastrointestinal tract is variable between different parts of the intestinal tract as well as between individuals. Studies have shown that *UGT1A*-expression is differentially downregulated in patients with liver, biliary and gastric cancer, which leads to a significant reduction of microsomal *UGT* activity. Therefore the *UGT* are suggested to represent risk factor genes of chemical carcinogenesis. However, this has not been shown directly, to date.

In order to investigate the cytoprotective role of human *UGT1A* proteins, human embryonic kidney cells (HEK-293) were stably transfected with individual *UGT1A* cDNAs. The stably transfected cells were exposed to typical human carcinogens (heterocyclic amines and heterocyclic aromatic hydrocarbons) and the effects of *UGT* expression were measured afterwards by quantification of cytotoxicity, cell proliferation and apoptosis. The experiments for the first time demonstrated a direct cytoprotective effect of the *UGT1A1*, *UGT1A3*, *UGT1A4*, *UGT1A7*, *UGT1A9* and *UGT1A10* proteins in cells exposed to the carcinogen 2-Amino-1-methyl-6-phenyl-1-H-imidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), which is present in cooked meat. Cytoprotection of cells treated with another food-borne carcinogen, 2-Amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQX), was demonstrated by *UGT1A4*, and in 7-Hydroxy-2-acetylaminofluorene (7-OH-AAF) treated cells by *UGT1A3*.

Measurement of apoptosis revealed an increase of apoptotic cells following benzo(α)pyrene exposition but no change in apoptosis following PhIP exposition. The proliferation of carcinogen treated cells was shown to be reduced after incubation with benzo(α)pyrene substrates but not with PhIP.

These findings underline the impact of UGT mediated cytoprotection since cells under the effect of PhIP mediated cytotoxicity do not undergo apoptosis and therefore are able to continue mitosis. This enables PhIP mediated cytotoxicity to be passed to subsequent cell generations, an effect not observed for benzo(α)pyrene metabolism. The cytoprotection experiments in this study demonstrate a direct cytoprotective role of selective UGT isoforms. They reinforce the role of the *UGT* supergenefamily as risk factor genes in chemically induced cancers.

Key words

- UDP-glucuronosyltransferases (UGT)
- Cytoprotection
- Chemical carcinogenesis

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 DIE ENTWICKLUNG DER <i>UGT</i> -GENFAMILIE	1
1.2 DIE GENETISCHE ORGANISATION DER <i>UGT</i>	3
1.3 STRUKTUR UND ZELLULÄRE ORGANISATION DER <i>UGT</i>	4
1.4 GEWEBSSPEZIFISCHE EXPRESSION	7
1.5 <i>UGT</i> -ASSOZIIERTE ERKRANKUNGEN	9
1.6 <i>UGT</i> IN DER CHEMISCHEN KARZINOGENESE	11
1.7 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	13
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 MATERIAL	14
2.1.1 Laborgeräte	14
2.1.2 Chemikalien	15
2.1.3 Enzyme	15
2.1.4 Kits	15
2.1.5 Vektoren	16
2.1.6 Größenmarker	16
2.1.7 Radiochemikalien	16
2.1.8 Zellkulturzubehör und -reagenzien	16
2.1.9 Zelllinien	17
2.1.10 Antikörper	18
2.1.11 PCR-Primer	18
2.1.12 Substrate	19
2.1.13 Standardpuffer	20
2.1.14 Reagenzien und Materialien für den <i>UGT</i> -Aktivitätstest	22
2.1.15 Nährmedien	23
2.2 METHODEN	24
2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen	24
2.2.2 Transformation kompetenter Bakterienzellen	24
2.2.3 Plasmid-Maxi-Präparation	24
2.2.4 Anlegen von Glycerinstocks	25
2.2.5 Passagieren von Zellen	25
2.2.6 Einfrieren und Lagerung von Zellen	25
2.2.7 Auftauen von Zellen	26
2.2.8 Transiente Transfektion von Zellen mit Hilfe von Liposomen	26
2.2.9 In-situ-Färbung von β -Gal-transfizierten Zellen mit X-Gal	26
2.2.10 Herstellung stabil transfizierter Zelllinien	27
2.2.11 Lactatdehydrogenase (LDH)-Zytotoxizitätsassay	28
2.2.12 Proliferationsassay durch Bromdesoxyuridin (BrdU)-Einbau	29
2.2.13 Apoptosefärbung mit Hilfe eines Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierten Caspase-Markers	30
2.2.14 Isolierung von Zellkompartimentmembranen (Mikrosomen)	30
2.2.15 Quantifizierung von Proteinen nach Bradford	31
2.2.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	31

2.2.17 Western Blot	32
2.2.18 Isolierung von mRNA aus Zellen	33
2.2.19 Reverse Transkription (cDNA Synthese)	33
2.2.20 Duplex Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
2.2.21 Auftrennung von DNA-Fragmenten	36
2.2.22 Katalytische Aktivität von UDP-Glukuronosyltransferasen (UGT-Aktivitätstest)	36
2.2.23 Durchflusszytometrische Messungen von FITC- und Propidiumiodid gefärbten Zellen	37
3. ERGEBNISSE	39
3.1 ETABLIEREN EINES ZELLKULTURMODELLS FÜR ZYTOPROTEKTIONSSTUDIEN	39
3.1.1 Auswahl einer geeigneten Zelllinie	39
3.1.2 Titration des Selektionsmediums für die stabile Transfektion	44
3.1.3 Herstellung von stabilen UGT1A-exprimierenden HEK-293 Zelllinien	44
3.2. OPTIMIERUNG DER ZELLKULTUR IM MIKROTITERMASSSTAB FÜR ZYTOTOXIZITÄTSSTUDIEN	48
3.2.1 Bestimmung der optimalen Zellzahl für den LDH-Assay	48
3.2.2 Bestimmung der Substrat-Expositionszeit	50
3.2.3 Bestimmung der Substratkonzentration	51
3.3. PRÜFUNG DER ZYTOPROTEKTION DURCH SELEKTIVE EXPRESSION INDIVIDUELLER UGT1A-PROTEINE	52
3.3.1 Nachweis im LDH-Assay	52
3.3.2 Untersuchung der Zellproliferation im Bromdesoxyuridin (BrdU)-Assay	54
3.3.3 Detektion von Apoptose nach Karzinogen-Exposition der UGT1A-exprimierenden Zellen	57
3.4 KONTROLLE DER KATALYTISCHEN AKTIVITÄT NACH 50 PASSAGEN	60
3.5 INDUKTION VON UGT-EXPRESSION DURCH KARZINOGEN-EXPOSITION	63
4. DISKUSSION	65
4.1 SIND STABILE ZELLINIEN EIN GEEIGNETES MODELL FÜR ZYTOPROTEKTIONSEXPERIMENTE?	65
4.2 WELCHE AUSSAGEN LASSEN DIE VERWENDETEN ASSAYS ZU?	67
4.3 WIE IST DIE ÜBERTRAGBARKEIT DER EXPERIMENTE AUF DIE PROTEKTION IN VIVO?	72
4.4. WIE WIRD DIE UGT-EXPRESSION REGULIERT?	74
4.5 AUSBLICK	76
5. ANHANG	78
5.1 LITERATURVERZEICHNIS	78
5.2 DANKSAGUNG	93
5.3 LEBENS LAUF	94

ABKÜRZUNGEN UND ANGLIZISMEN

Abb	Abbildung
AhR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
AK	Antikörper
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
β-Gal	β-Galactosidase
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
°C	Grad Celsius
¹⁴ C	radioaktiver Kohlenstoff
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
compound heterozygot	unterschiedliche allelische Ausprägung in verschiedenen Zellen
⁵¹ Cr-Release	Abgabe von radioaktivem Chrom
C-terminal	Carboxy-terminales Ende eines Proteins
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i> , und andere
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gravitationskraft (9,81 m/s)
G418	Antibiotikum Geneticin
h	Stunde
HRP	Meerrettichperoxydase
IgG	Immunglobulin Isotyp G
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
λ	Wellenlänge des Lichts
LDH	Lactat-Dehydrogenase
m	Milli
M	Mol
μ	Mikro
mA	Milli-Ampere
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Nano
N-terminal	Amino-terminales Ende eines Proteins
OD	optische Dichte
OH	Hydroxyl-
p	pico
PAH	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Poly (<i>dC-dA</i>)	Poly-Deoxycytosin-deoxyadenosin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
S1	Sicherheitsstufe 1
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TA-Repeats	Wiederholung von Thymidin und Adeninnukleotiden
TATA	Promotersequenz (Thymidin- und Adeninnukleotide)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit, internationale Einheit der Enzymaktivität
UDPGA	Uridindiphosphat-Glukuronsäure
UGT	<u>U</u> ridindiphosphat- <u>G</u> lukuronosyltransferase
V	Volt
wells	Vertiefungen einer Mikrotiter- bzw. Zellkulturplatte
XRE	Xenobiotic response element
2q37	Langer Arm (queue) von Chromosom 2, Subregion 3-7

1. EINLEITUNG

Durch den Kontakt des Individuums mit der Umwelt nehmen die Körperzellen Nahrungsmittel und sonstige Xenobiotika zur Bildung von Energiereserven und zur Erhaltung des Stoffwechsels sowie Medikamente zu therapeutischen Zwecken auf. Daneben muss der Körper über effiziente Wege verfügen, diese potentiell toxischen Stoffe und deren Metaboliten aus den Zellen wieder zu eliminieren. Die Ausscheidung lipophiler endogener Substanzen wie Bilirubin, Gallensäure oder Steroidhormone erfolgt mit Hilfe der Biotransformation, die in der Regel aus zwei Phasen besteht.

Im Phase I-Stoffwechsel werden aus lipophilen Substanzen durch Monooxygenasen, vor allem der Cytochrom P-450-Superfamilie (CYP) in den Membranen der Mitochondrien und des Endoplasmatischen Retikulums oxydative Metaboliten erzeugt, die in einer zweiten Phase durch Konjugationsreaktionen mit polaren Molekülen in hydrophile Verbindungen überführt werden (Dutton, 1980). Zu den wichtigsten Phase II-Reaktionen gehören die Azetylierung (Sim *et al.*, 2000), die Sulfatierung (Glatt, 2000) und die Glukuronidierung (Dutton, 1980). Im menschlichen Stoffwechsel nimmt die Glukuronidierung eine zentrale Rolle ein (Tukey und Strassburg, 2000). Katalysiert wird der Transfer eines Glukuronsäurerestes auf kleine hydrophobe Moleküle über Hydroxyl-, Carboxyl-, Sulfuryl-, sowie primäre, sekundäre und tertiäre Aminbindungen zu wasserlöslichen Glukuroniden durch die Superfamilie der Uridindiphosphat-Glukuronosyltransferasen (UGT) (EC 2.4.1.17). Die gebildeten Konjugate sind hydrophiler als die Ausgangssubstanz und können daher über die Niere oder in der Galle eliminiert werden (Dutton, 1980).

1.1 DIE ENTWICKLUNG DER UGT-GENFAMILIE

Metabolisierungsenzyme sind sehr früh im Verlauf der Evolution entstanden, um im Organismus die Verarbeitung endogener Moleküle zu gewährleisten und um Umweltsubstanzen zur Energiegewinnung zu nutzen (Nebert, 1994).

Homologe Sequenzen in Bakterien, Pflanzen und Tieren deuten darauf hin, dass die heute existierenden UGT-Isoformen auf ein gemeinsames Ahnengeng zurückgehen (Mackenzie, 1995). Während der Evolution sind vermutlich durch Genduplikation und Genkonversion immer neue Varianten der UGT entstanden, die dem Organismus selektive Vorteile brachten, indem sie die Nutzung neuer Nahrungsquellen oder die Besiedelung neuer Lebensräume ermöglichten (Brierley und Burchell, 1993). Basierend auf der evolutionären Divergenz sind die bisher gefundenen Säuger-UGT aufgrund von Aminosäuresequenzvergleichen in 2 Familien gegliedert worden, *UGT1* und *UGT2*. Die *UGT2*-Familie wurde ihrerseits in 2 Unterfamilien eingeteilt, *UGT2A* und *UGT2B* (Burchell *et al.*, 1991, Mackenzie *et al.*, 1997, Tukey und Strassburg, 2001) (Abb. 1.1).

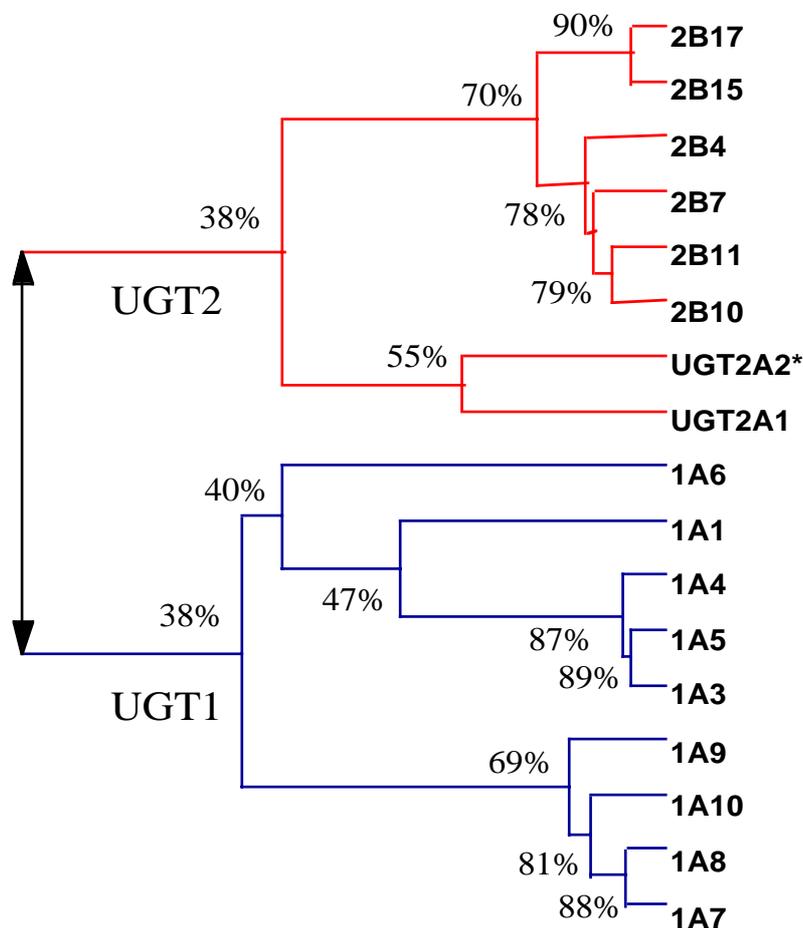


Abb. 1.1: Phylogenetischer Stammbaum humaner UGT

In diesem Dendrogramm sind die Sequenzen dargestellt, die die Exon1 Regionen der UGT kodieren (vgl. Abschnitt 1.2). Die %-Zahlen geben die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz an. UGT2A2 wurde kürzlich in einem BAC Klon401_E05 identifiziert (Abb. nach Tukey und Strassburg, 2001).

1.2 DIE GENETISCHE ORGANISATION DER UGT

Der humane *UGT1A*-Genort umfasst mehr als 200 kb und ist als Cluster auf Chromosom 2q37 lokalisiert (Harding *et al.*, 1990, Ritter *et al.*, 1992). Er enthält die Exons für mindestens 12 Transkripte, wovon drei im Exon-Bereich ein Stoppcodon enthalten und daher als Pseudogene bezeichnet werden (Owens und Ritter, 1995, Burchell *et al.*, 1998), während die *UGT2B*-Gene auf Chromosom 4q13 gefunden wurden (Monaghan *et al.*, 1994).

Während die Mitglieder der *UGT2*-Familie als individuelle Gene kodiert sind, ist die Organisation der Genorte für die *UGT1A*-Proteine ungewöhnlich. Durch expansive Duplikation und divergente Evolution der 5'-Region des *UGT1A*-Locus entstand eine Serie einzigartiger Exons (Owens und Ritter, 1995). Die verschiedenen *UGT1A*-Isoformen werden durch multiple Transkripte des *UGT1A*-Locus generiert. Dabei werden den gemeinsamen Exons II-V durch RNA-Splicing individuelle Exons I hinzugefügt (Emi *et al.*, 1995) Die Anzahl der Exons ist speziesspezifisch. Beim Menschen wurden bisher 12 Exon I-Kassetten identifiziert, bei der Ratte neun. Die vier am 3'-Ende liegenden Exons II -V kodieren für den identischen C-terminalen Abschnitt der Proteine, während die individuellen stromaufwärts liegenden Exons I für den N-terminalen Anteil kodieren. Jedes Exon I hat ein flankierendes TATA-ähnliches Element zwischen -31 und -25 relativ zum Transkriptionsstart, sowie eine Donor-Splice Stelle an der 3'-Exon-Intron-Grenze. Die nächste Akzeptor-Splice Stelle findet sich erst wieder an 5'-Ende von Exon II, so dass die zwischen Exon I und Exon II liegenden Sequenzen durch Splicing entfernt werden, auch wenn sie weitere Exon I-Sequenzen enthalten (Tukey und Strassburg, 2000) Durch das Splicing können beim Menschen 12 individuelle *UGT1A*-Transkripte unabhängig voneinander reguliert werden (Abb. 1.2). Die Sequenzen für *UGT1A2*, *UGT1A11* und *UGT1A12* enthalten ein Stoppcodon und gelten daher als Pseudogene. (Owens und Ritter 1995).

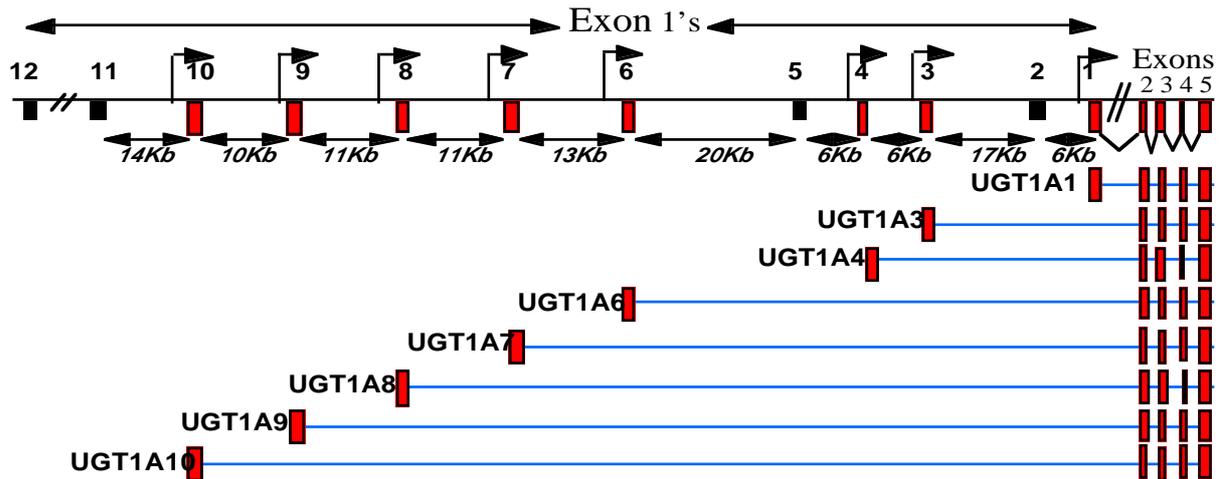


Abb 1.2 Organisation des humanen *UGT1A*-Locus

UGT1A-Transkripte werden von individuellen Transkriptionsstartstellen einzelner Exons I generiert. Durch RNA-Splicing werden Intronsequenzen und 3' vom Transkriptionsstart liegende Exons I eliminiert. Individuelle *UGT1A*-mRNAs beinhalten ein variables Exon I-Transkript und konstante Exon II-V-Transkripte. Pfeile stellen die vor jedem Exon I vorhandenen Promotorelemente dar. *UGT1A2*, 11 und 12 sind Pseudogene und werden nicht exprimiert. In humanen Geweben wurde bislang noch keine *UGT1A5*-cDNA isoliert (nach Tukey und Strassburg, 2001).

1.3 STRUKTUR UND ZELLULÄRE ORGANISATION DER UGT

Der *UGT1A*-Genlocus kodiert Proteine mit einer Molekülmasse von etwa 56 kDa mit 520-530 Aminosäuren. Davon teilen sich die Mitglieder der *UGT1A*-Familie die C-terminalen 246 Aminosäurereste, während die Exon I-kodierten N-terminalen Aminosäuren divergent sind und vermutlich die Spezifität einzelner Isoformen ausmachen (Tephly und Burchell, 1990). Subzellulär wurden die Enzyme im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Dutton, 1980). Ein Signalpeptid im aminoterminalen Abschnitt aller UGT außer *UGT1A10* dirigiert das Protein während der Translation zum Endoplasmatischen Retikulum und wird anschließend entfernt (Strassburg *et al.*, 1997b). Funktionell lässt sich das UGT-Protein in verschiedene Domänen unterteilen. Innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums wird im Bereich der individuellen N-terminalen Hälfte des Enzyms die Substratbindung angenommen, während in der konservierten C-terminalen Region wahrscheinlich die Bindung der UDP-Glukuronsäure erfolgt (Meech und Mackenzie, 1997), wobei die Bindungsmotive bisher nicht identifiziert worden sind (Abb. 1.3). Die Verankerung in der Membran

erfolgt vermutlich über eine hydrophobe, α -Helix-bildende Sequenz aus 17 Aminosäuren (Meech und Mackenzie, 1997). Die Beendigung der Membrandurchdringung ist noch nicht abschließend geklärt. Es gibt sowohl Hinweise für ein hydrophobes Haltesignal aus 2 Lysinresten (Kinosaki *et al.*, 1993), als auch Ergebnisse von Meech und Mackenzie (1997), die eine statische Retention des Proteins favorisieren. Nur ein kleiner Bereich aus 19-26 Aminosäuren verbleibt zytosolisch. Basierend auf Trunkierungsexperimenten erscheint dieser kleine Abschnitt jedoch wichtig für die Erhaltung der katalytischen Aktivität. Möglicherweise interagiert er mit akzessorischen Proteinen außerhalb des ER (Meech *et al.*, 1996).

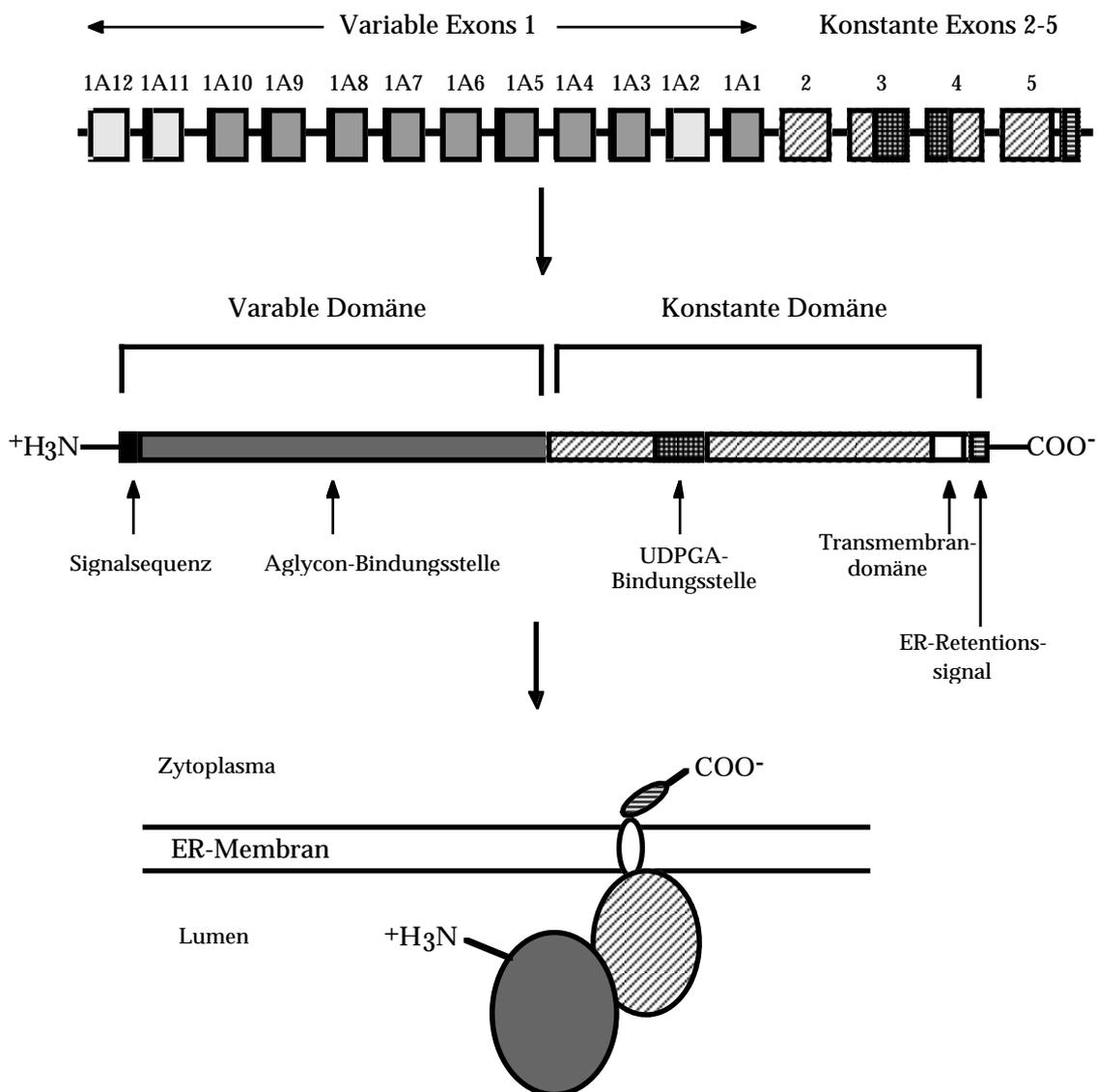
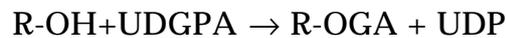


Abb. 1.3 Darstellung der genetischen Organisation, der Genstruktur und der subzellulären Organisation der UGT (nach Tephly und Burchell 1990 und Burchell *et al.*, 1998)

Durch UGT katalysierte Konjugationsreaktionen folgen in der Regel nach einer oxydativen Funktionalisierung der Zielsubstrate. Einige Verbindungen erreichen jedoch bereits in hydroxylierter Form den Organismus, so dass die Konjugation mit Glukuronsäure für diese oxydierten Substrate den ersten metabolischen Schritt bilden kann. So sind zum Beispiel Bilirubin, phenolische Verbindungen, Amine und Carbonsäuren Substrate für UGT, die vor der Glukuronidierung keinen Phase I Metabolismus obligat durchlaufen müssen (Brierley und Burchell, 1993).

Im Allgemeinen sieht das Reaktionsschema der UGT-katalysierten Glukuronidierung folgendermaßen aus:



Anstelle der Hydroxylgruppe kann die Glukuronidierung auch über eine Amino- (NH_2), Sulfuryl- (SH), Carbonyl- (CO) oder eine Carboxyl- (COOH) Gruppe erfolgen (Bock, 1994). Das Aglykon erreicht die Zelle über das Blut oder bei Oberflächenepithelien direkt. Für Bilirubin geschieht dies über Rezeptoren auf den Hepatozyten (Stremmel und Diede, 1990). Für andere Aglykone ist die Internalisierung, der intrazelluläre Transport, sowie die Translokation in das Lumen des ER noch weitgehend ungeklärt. Die UDP-Glukuronsäure (UDPGA), das Donorsubstrat der Glukuronidierung, wird im Zytosol in zwei Schritten aus Glukose-1-Phosphat synthetisiert. Der Transport der hydrophilen UDPGA ins Lumen des ER erfordert aktive Transportprozesse, die allerdings noch nicht geklärt sind. Es gibt jedoch Hinweise, dass intravesikuläre Glukuronide die Aufnahme der UDPGA in die Vesikel *trans* stimulieren. Das könnte für einen Antiport-Mechanismus von Glukuroniden und UDPGA sprechen (Banhegyi *et al.*, 1996). Für Bilirubinglukuronide wurde ein Transportweg aus der Zelle über das Mikrotubulinetzwerk (Crawford und Gollan, 1988) und den basosinusoisalen organischen Anionen-Transporter (OATP) in die Galle beschrieben (Paulusma *et al.*, 1996).

1.4 GEWEBSSPEZIFISCHE EXPRESSION

Lange wurde der Leber als zentralem Stoffwechselorgan der Hauptanteil der Glukuronidierung zugeschrieben. Alle bis 1996 identifizierten und charakterisierten Mitglieder der *UGT1*- und *UGT2*-Familie wurden ausschließlich aus der Leber kloniert. Für die *UGT1A*-Familie waren das *UGT1A1* (Ritter *et al.*, 1991), *UGT1A3* (Mojarrabi *et al.*, 1996), *UGT1A4* (Ritter *et al.*, 1991), *UGT1A6* (Harding *et al.*, 1988) und *UGT1A9* (Wooster *et al.*, 1991). Von den *UGT2B*-Isoformen wurden in der Leber *UGT2B4* (Fournell-Giglieux *et al.*, 1989; Jin *et al.*, 1993b; Ritter *et al.*, 1992b), *UGT2B7* (Coffmann *et al.*, 1997; Ritter *et al.*, 1991; Ritter *et al.*, 1992b), *UGT2B10* (Jin *et al.*, 1993c), *UGT2B11* (Beaulieu *et al.*, 1998) und *UGT2B15* (Chen *et al.*, 1993) identifiziert. Hauptsubstrate für die *UGT2B*-Isoformen sind endogene Steroide, darunter Androgene (Strasser *et al.*, 1997) und Gallensäuren (Meech und Mackenzie 1997). Außerhalb der Leber wurden *UGT2B*-Isoformen daher vor allem in steroidsensitiven Organen nachgewiesen wie *UGT2B15* und *UGT2B17* in der Prostata (Beaulieu *et al.*, 1997; Belanger *et al.*, 1998). Im Gastrointestinaltrakt konnte *UGT2B4* im Dünndarm nachgewiesen werden (Strassburg *et al.*, 2000), sowie *UGT2B7*, *UGT2B10* und *UGT2B15* im Kolon (Tukey und Strassburg 2001). Eine Isoform der Familie 2 wurde aus dem olfaktorischen Epithel der Nase isoliert (Lazard *et al.*, 1990 und 1991, Jedlitschly *et al.*, 1999). Sie glukuronidiert lipophile Geruchsstoffe und beendet damit die Geruchswahrnehmung. Aufgrund der geringeren Sequenzhomologie zu den anderen *UGT2B*-Isoformen wird sie als *UGT2A1* bezeichnet und bildet mit dem kürzlich in einem BAC Klon identifizierten *UGT2A2* (Tukey und Strassburg 2001) einen Vertreter der *UGT2A*-Unterfamilie.

Die Mukosa des Gastrointestinaltrakts stellt eine der größten metabolisch aktiven Oberflächen dar und bildet vor dem Kontakt mit der Leber die erste Kontaktstelle für Pharmaka und Xenobiotika. Durch die Entwicklung einer sensitiven RT-PCR mit spezifischen Primern war es möglich, die Expression von stark homologen Sequenzen der *UGT1A*-Isoformen im Gastrointestinaltrakt nachzuweisen. Dabei zeigte sich sowohl eine differentielle Expression einzelner *UGT1A*-Isoformen in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts, als auch eine interindividuell unterschiedliche Expression einzelner *UGT1A*-Isoformen

(Strassburg *et al.*., 1997b, 1998a, 1998b, 1999a, 1999b, 2000). Aus Magengewebe konnten die extrahepatischen Isoformen UGT1A7 und UGT1A10, aus dem Kolon UGT1A8 kloniert werden (Strassburg *et al.*, 1997b, 1998b). Ein Vergleich der Glukuronidierungsaktivität von Leber- und Kolonmikrosomen zeigte für verschiedene phenolische Substrate, Flavone, Steroide und Gallensäuren jeweils eine höhere Glukuronidierungsaktivität in den Lebermikrosomen, obwohl im Kolon mehr Isoformen der *UGT1A*-Familie exprimiert werden (Strassburg *et al.*, 1999a). Dagegen zeigte ein Vergleich der UGT-Aktivitäten von Dünndarm- und Leberproben für die Karzinogene 7-Hydroxy-Benzo(α)pyren, N-Hydroxy-PhIP und 3-Hydroxy-Acetylaminofluoren im Jejunum deutlich höhere Aktivitäten als in der Leber (Strassburg *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse lassen auf eine komplexe gewebspezifische und individuelle Regulation der UGT-Aktivität schließen.

Gut charakterisiert sind die Substratspezifitäten vieler UGT1A-Proteine. UGT1A1 ist die einzige effiziente Isoform der Bilirubin-Glukuronidierung (Ritter *et al.*, 1991, Bosma *et al.*, 1994). Darüber hinaus hat UGT1A1 eine geringer ausgeprägte Substratspezifität für einige Phenole, Anthraquinone, Flavone und Steroide. Für UGT1A4 wurde die Glukuronidierung von Pharmaka und Xenobiotika mit Aminstruktur gezeigt (Green *et al.*, 1994, 1996). UGT1A6 weist eine eingeschränkte Substratspezifität für planare phenolische Substanzen auf (Burchell *et al.*, 1995).

UGT1A7 zeigt ein breites Substratspektrum gegenüber phenolischen Substanzen, Anthraquinonen, Flavonen, Coumarinen, Naphtolstrukturen und Karzinogenen wie Benzo(α)pyren (Strassburg *et al.*, 1998b) und entspricht damit etwa dem Substratspektrum von UGT1A9 (Ebner und Burchell, 1993). Für UGT1A8 wurde die Glukuronidierung von phenolischen Substanzen, Coumarinen, Anthraquinonen und Flavonoiden nachgewiesen (Cheng *et al.*, 1999). UGT1A10 zeigte neben der Glukuronidierungsaktivität von planaren und komplexen phenolischen Substraten eine Spezifität gegenüber Steroidhormonen, die für die anderen UGT1A-Proteine untypisch ist. (Strassburg *et al.*, 1998b). UGT1A5 wurde bisher noch nicht kloniert, da seine Expression in bislang keinem Gewebe nachgewiesen werden konnte. Die Aussagen über Substratspezifitäten der einzelnen Isoformen variieren zum Teil erheblich. Ursache dafür kann sowohl die Verwendung verschiedener Expressionssysteme wie zum Beispiel Sf9-

Insektenzellen, COS-7 oder HEK-293 Säuger-Zelllinien sein, als auch die Anwendung unterschiedlicher UGT-Aktivitätsassaybedingungen (Tukey und Strassburg, 2000, Guengerich *et. al.*, 1997).

1.5 UGT-ASSOZIIERTE ERKRANKUNGEN

Abschnitt 1.3 hat gezeigt, dass die meisten UGT mit Ausnahme von UGT1A1 (Bilirubin) ein breites und überlappendes Substratspektrum aufweisen. Die klinische Relevanz dieser Enzyme lässt sich durch die Identifizierung und Charakterisierung aktivitätsmodulierender Polymorphismen beantworten. Polymorphismen für einzelne UGT wurden für UGT1A1, UGT1A6, UGT2B7 und UGT2B15 gefunden (Mackenzie *et al.*, 2000). Eine klinische Relevanz ist am besten für Polymorphismen des *UGT1A1*-Gens beschrieben worden. Da diese Isoform das einzig effiziente Bilirubin-UGT darstellt, sind die UGT1A1-assozierten Krankheitsbilder durch eine unkonjugierte Hyperbilirubinämie gekennzeichnet.

1952 beschrieben Crigler und Najjar eine schwere Erkrankung von Neugeborenen. Eine unkonjugierte Hyperbilirubinämie mit Serumbilirubinspiegeln von über 350 $\mu\text{M/l}$ führte bei fünf von sechs Betroffenen zum Tod. Die nach den Autoren benannte Erkrankung wird je nach Konzentration des unkonjugierten Bilirubins in zwei Typen eingeteilt. Die 1952 beschriebene schwere Form der Hyperbilirubinämie mit Serumbilirubinspiegeln von 340 und 850 $\mu\text{M/l}$ wird als Crigler-Najjar Typ I bezeichnet (Seppen *et al.*, 1994). Ursache ist ein kompletter Ausfall der UGT1A1-Isoform, verursacht durch Punktmutationen, Deletionen oder Substitutionen, die zu einem verkürzten oder inaktiven UGT1A1-Protein führen. Die Betroffenen sind entweder für den Defekt homozygot oder „compound“ heterozygot, so dass kein anderes Allel den Defekt kompensieren kann (Labrune *et al.*, 1994, Strassburg und Manns, 2000).

Arias beschrieb 1962 eine Form von unkonjugierter Hyperbilirubinämie, die heute als Crigler-Najjar Typ II bezeichnet wird und durch die Gabe von Phenobarbital therapierbar ist. Die Serumbilirubinspiegel liegen bei 100 bis 340 $\mu\text{M/l}$. Bei Homozygoten führt der Defekt nicht zu einem Totalausfall des Enzyms, sondern

zu einer verminderten Aktivität. Bei Heterozygoten kann das intakte Allel den Ausfall teilweise kompensieren.

Eine als Gilbert Syndrom bezeichnete milde Form der unkonjugierten Hyperbilirubinämie wurde bereits 1901 von Gilbert und Lereboullet beschrieben.

Sie betrifft 2-5% der Bevölkerung. Ursache können heterozygote Punktmutationen sein oder verlängerte TA Repeats im Promoter des *UGT1A1*-Gens (Bosma *et al.*, 1993, Monaghan *et al.*, 1996). Diese Erkrankung erfordert in der Regel keine medizinische Therapie. Neuere Studien zeigten bei 15 % der Bevölkerung einen Polymorphismus im Promoter von *UGT1A1*, der durch eine unterschiedliche Länge von TA-Repeats gekennzeichnet ist. Dabei führt eine steigende Anzahl der Repeats zu einer verminderten *UGT1A1*-Expression (Mackenzie *et al.*, 2000).

Insgesamt sind bislang 33 polymorphe Allele des *UGT1A*-Locus beschrieben worden (Strassburg und Manns, 2000).

UGT-Proteine spielen auch eine Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen. 1973 wurden humane Autoantikörper entdeckt, die gegen das Endoplasmatische Retikulum der Leber und der proximalen Nierentubuli gerichtet waren (Rizzetto *et al.*, 1973). 1983 wurde ein als LKM-3 (liver-kidney microsomal antibody) bezeichneter Antikörper bei Patienten mit chronischer Hepatitis D identifiziert (Crivelli *et al.*, 1983). In späteren Untersuchungen konnte eine Reaktivität gegen UGT der Familie 1 gezeigt werden (Philipp *et al.*, 1994). Diese LKM-3 Autoantikörper dienen auch als Marker bei 10% der Patienten mit Autoimmunhepatitis Typ 2 (Strassburg *et al.*, 1996).

Andere durch UGT-Defizienzen verursachte Erkrankungen sind schwerer nachweisbar, weil sich die Substratspezifitäten einzelner Isoformen überlappen, und weil in den verschiedenen Geweben mehrere Isoformen simultan exprimiert werden. Es gibt jedoch Hinweise, dass Veränderungen in der Expression einzelner Isoformen die chemische Karzinogenese in diesen Geweben begünstigen.

1.6 UGT IN DER CHEMISCHEN KARZINOGENESE

Ein signifikanter Anteil humaner Tumoren wird durch chemische Substanzen initiiert, die wir als Umweltgifte aufnehmen oder in Form von Nahrungs- und Genussmitteln zu uns nehmen (Doll und Peto, 1981). Beim Kochen und Braten von Fleisch entsteht eine hohe Anzahl mutagener heterozyklischer Amine. Die häufigsten in der westlichen Ernährung sind 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinolin (IQ), 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxalin (MeIQX) und 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PHIP). Bei Ratten wurde eine DNA-Adduktbildung durch alle diese aktivierten Substanzen nachgewiesen (Ohgaki *et al.*, 1984 und 1987, Esumi *et al.*, 1989). Für PhIP wurde eine DNA-Adduktbildung auch bei Affen nachgewiesen (Adamson *et al.*, 1990). Die karzinogene Wirkung dieser Substanzen wurde noch nicht direkt nachgewiesen, epidemiologische Studien zeigten jedoch einen Zusammenhang zwischen der Aufnahme von gekochtem Fleisch und der Entstehung von Kolorektalkrebs beim Menschen (Gerhardsson de Verdier *et al.*, 1991).

Auch die zur Gruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH) gehörenden Benzo(α)pyrene (BaP) gelangen durch die Inhalation von Zigarettenrauch und die Einnahme von erhitztem Fleisch in den Körper und werden für die Initiation von Tumoren in verschiedenen Organsystemen verantwortlich gemacht. Bei UGT1A-defizienten Gunn Ratten konnte gezeigt werden, dass die Glukuronidierung von BaP-Metaboliten reduziert war. Das führte zu einer gesteigerten Adduktbildung von BaP-Metaboliten an DNA und Protein und damit zu einer erhöhten Zytotoxizität *in vitro* (Hu und Wells, 1992). Diese Daten stützen die Hypothese, dass eine genetisch bedingte UGT-Defizienz eine Prädisposition für die chemische Karzinogenese darstellen kann.

Untersuchungen der UGT-Aktivität bei Patienten mit Adenokarzinomen des Magens zeigten eine signifikante Herabregulation von UGT1A1-, UGT1A6- und UGT1A3-Transkripten in gepaarten Tumor-/Normalgewebeproben (Strassburg *et al.*, 1998a). Ebenso konnte bei Patienten mit hepatozellulären Karzinomen eine verminderte Expression der Isoformen UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, und UGT1A9 gezeigt werden, sowie eine Herabregulation von UGT1A4 und UGT1A10 in

cholangiozellulären Karzinomen (Strassburg *et al.*, 1997a). Mikrosomen von Patienten mit Ösophaguskarzinomen zeigten eine fünffach geringere Glukuronidierung von 7-Hydroxybenzo(α)pyren gegenüber normalen Ösophagusmikrosomen (Strassburg *et al.*, 1999b). Ösophagus, Magen und Kolon sind Organe, die eine höhere Tumorzinzidenz aufweisen als die Abschnitte des Dünndarms. Der Anteil von Kolonkrebs an allen neu diagnostizierten Tumoren beträgt 9,7%, er ist der zweithäufigste Krebs beim Menschen (Parkin *et al.*, 1999). Ein Vergleich der Glukuronidierungsaktivität in den verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts zeigte neben der Leber die höchste Aktivität im Jejunum (Strassburg *et al.*, 1999a, 2000), während die Glukuronidierung im Ösophagus, im Magen (Strassburg *et al.*, 1998b, 1999b) und im Kolon (Peters und Jansen 1988, Peters *et al.*, 1991, Strassburg *et al.*, 1999a) deutlich geringer war (Abb. 1.4). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die UGT eine wichtige Barriere in der chemischen Karzinogenese bilden, und dass Polymorphismen und differentielle Genregulation Risikofaktoren in der Prädisposition für die Bildung von Tumoren darstellen können.

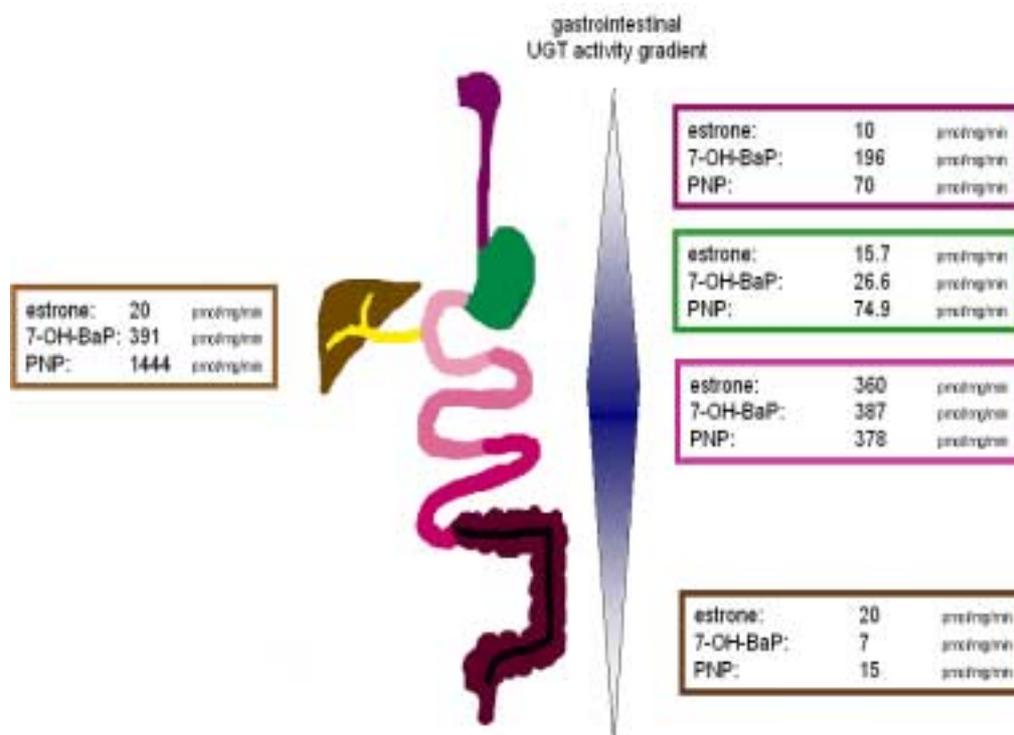


Abb 1.4: Gastrointestinaler Aktivitätsgradient

Für die Substrate Estron, 7-Hydroxybeno(α)pyren und Para-Nitrophenol (PNP) ist die UGT-Aktivität im Ösophagus, im Magen, im Dünndarm, im Kolon und in der Leber dargestellt. Die höchsten Aktivitäten wurden in der Leber und im Jejunum erreicht, während sowohl der Ösophagus und der Magen als auch das Kolon sehr geringe UGT-Aktivität zeigten (Tukey und Strassburg 2001).

1.7 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Tierexperimentelle Studien oder Untersuchungen humaner und tierischer Gewebe kommen der *in vivo* Situation am nächsten. Die zytoprotektive Rolle einzelner UGT-Isoformen lässt sich damit jedoch schlecht untersuchen, da in den Geweben stets mehrere UGT-Isoformen simultan exprimiert werden, und die meisten Substrate auch durch mehrere Isoformen umgesetzt werden können (Tukey und Strassburg, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein Zellkulturmodell etabliert werden, das die Isoformen der *UGT1A*-Genfamilie stabil und selektiv exprimiert. Dieses Modell sollte die Grundlage für Untersuchungen zur protektiven Wirkung einzelner *UGT1A*-Isoformen gegenüber verschiedenen Nahrungsmittelkarzinogenen bilden. Dosis-Wirkungsbeziehungen sollten die Auswahl einer geeigneten Substratkonzentration ermöglichen. Die Wirkung der Karzinogene auf die Zellen sollte über verschiedene Endpunkte ermittelt werden; die Zytotoxizität, das Proliferationsverhalten und die Apoptose.

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die verwendeten Karzinogene in der Lage sind, die Expression von UGT-Isoformen und damit ihre eigene Glukuronidierung zu induzieren.

Die gewonnenen Ergebnisse sollten die Beteiligung einzelner UGT-Isoformen an der Karzinogenglukuronidierung nachweisen und dadurch die protektive Wirkung der UGT in der nahrungsmittelbedingten Karzinogenese in der intakten Zelle erstmalig direkt belegen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Laborgeräte

Spektralphotometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, Freiburg
Phosphoimager Fujifilm BAS 1000	Fuji, Düsseldorf
Ultraschallgerät Sonoplus	Bandelin, Berlin
Power Supply Modell 1000/500	Bio-Rad, München
Gelelektrophoresekammern, vertikal	Bio-Rad, München
Gelelektrophoresekammern, horizontal	Bio-Rad, München; Scie-Plas, UK
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Technoflow	Integra Biosciences, Fernwald
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Stickstofftank	Messer Griesheim, Krefeld
Lichtmikroskop TMS	Nikon, Düsseldorf
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX 60	Olympus, Hamburg
FACScalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Megafuge 3.0 R	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge Avanti TA J-30I	Beckmann, München
Ultrazentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Vakuumbzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
PCR-System Gene Amp 2000	Perkin Elmer, Weiterstadt
UV-Schirm 312 nm	Bachofer, Reutlingen
Photodokumentationssystem Win TV	Hauppauge, Mönchengladbach
Thermodrucker	Sony, Köln
Analysewaage MC1	Sartorius, Göttingen
Homogenisator RZR 2040	Heidolph, Nürnberg
Benchmark Microplate Reader	Biorad, München
Schüttelschrank TH 25	Edmund Bühler, Hechingen

2.1.2 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden für diese Arbeit Materialien von den folgenden Firmen bezogen:

Applichem	Darmstadt
J.T. Baker	Deventer, Holland
Fluca	Buchs, Schweiz
Gibco BRL	Eggenstein
ICN	Ohio, USA
Merck	Darmstadt
Pharmacia Biotech	Uppsala, Schweden
Riedel de Haen	Seelze
Roth	Karlsruhe
Serva	Heidelberg
Sigma Aldrich	Deisenhofen

2.1.3 Enzyme

Taq Polymerase (Puffer B)	Promega, Heidelberg
Vent Polymerase	NEB, Schwalbach
Vent (exo-) Polymerase	NEB, Schwalbach

2.1.4 Kits

High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Mannheim
Plasmid Maxi Kit	Quiagen, Hilden
RNA Amplification Kit	Gibco BRL, Eggenstein
Cytotoxicity Detection Kit	Roche, Mannheim
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche, Mannheim
CaspACE FITC-VAD-FMK <i>In Situ</i> Marker	Promega, Heidelberg
DC- Proteinassay	Bio-Rad, München

2.1.5 Vektoren

pcDNA 3.1neo(-)	Invitrogen, Groningen,NL
pSVβ-Gal	Promega, Heidelberg

2.1.6 Größenmarker

100 bp DNA-Marker	NEB, Schwalbach
1 Kb DNA-Marker	NEB, Schwalbach
Proteinstandard	NEB, Schwalbach

2.1.7 Radiochemikalien

¹⁴ C-UDP-Glukuronsäure	ICN, Irvine, USA
-----------------------------------	------------------

2.1.8 Zellkulturzubehör und -reagenzien

Zellkulturflaschen, -schalen, Röhrchen und Reaktionsgefäße wurden von den Firmen Nunc, Falcon, Greiner und Eppendorf bezogen.

Multipette	Eppendorf, Hamburg
8-Kanal-Pipette	Costar, Tübingen
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Gibco BRL Eggenstein
DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium) mit Glutamax, 4500 mg/l Glukose	Gibco BRL, Eggenstein
Opti-MEM mit Glutamax (serumfreies MEM)	Gibco BRL, Eggenstein
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin 10.000 U/ml/ Streptomycin 10 mg/ml	Gibco BRL, Eggenstein
Trypsin/EDTA	Gibco BRL, Eggenstein
Lipofectin Reagent	Gibco BRL, Eggenstein
G 418 (Genitacin)	Gibco BRL, Eggenstein
Glutaraldehyd (50% Lösung in H ₂ O)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Einfriermedium: 60% FKS, 30% RPMI, 10% DMSO	

2.1.9 Zelllinien

Hep-G2

Herkunft: Humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie

Quelle: American Type Culture Collection, Rockville, Maryland/USA
(ATCC HB-8065)

Risikokategorie: S1

Medium: 90% RPMI 1640, 10% FKS

Bezug: DSMZ, Braunschweig, DSMZ Nr. ACC 180

HEK-293

Herkunft: Adenovirus Typ 5 transformierte humane embryonale Nierenzellen

Quelle: American Type Culture Collection, Rockville, Maryland/USA
(ATCC CRL-1573)

Risikokategorie: S1

Medium: 90% Dulbecco's MEM, 10% FKS

Bezug: DSMZ, Braunschweig, DSMZ Nr. ACC 305

KatoIII

Herkunft: Humane Magenkarzinomzellen

Risikokategorie: S1

Medium: 80% RPMI 1640, 20% FKS

Bezug: American Type Culture Collection (ATCC HTB 103)

COS-7

Herkunft: SV40-transformierte African green monkey Zellen

Risikokategorie: S1

Medium: 90% DMEM/ 10% FKS

Bezug: American Type Culture Collection (ATCC CRL-1651)

Bakterienzellen:

DH5 α

Gibco BRL, Eggenstein

2.1.10 Antikörper

- LKM3-positives Serum (Strassburg *et al*, 1996) (1:3000 verdünnt in TBS-Tween, 5% Magermilchpulver)
- Ziege- α -Mensch IgG, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, Dianova, Hamburg (1:4000 verdünnt s.o.)
- Kaninchen α -Mensch Antikörper gegen die konstante Region von UGT1A (Strassburg *et al*, 1998b) (1:2000 verdünnt s.o., zum Nachweis von UGT1A10)
- Ziege- α -Kaninchen IgG, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, Dianova, Hamburg (1:3000 verdünnt s.o.)

2.1.11 PCR-Primer

β -Aktin:	vorwärts:	5'-ggcggcaccacatgtaccct-3'
	rückwärts:	5'-aggggcccggactcgcatact-3'
UGT1A1	vorwärts:	5'-aacaaggagctcatggcctcc-3'
UGT1A3	vorwärts:	5'-tggtgaacaatatgtctttgggtcta-3'
UGT1A4	vorwärts:	5'-gaaggaatttgatcgcgttac-3'
UGT1A5	vorwärts:	5'-ggtggtggtcctcacctg-3'
UGT1A6	vorwärts:	5'-tcctggctgagtatttgggcc-3'
UGT1A7	vorwärts:	5'-tgccgatgctcgtggacg-3'
UGT1A8	vorwärts:	5'-ggtcttcgccaggggaatagg-3'
UGT1A9	vorwärts:	5'-ggaggaacatttattatgccaccg-3'
UGT1A10	vorwärts:	5'-cctcttctatgtccccaatga-3'
Gemeinsame rückwärts-Primer für UGT1A1, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10:		5'-gttcgaagattcgatggtcg-3'
Gemeinsame rückwärts-Primer für UGT1A3, 1A4, 1A5:		5'-ccaatgaagaccatgttgggc-3'

(Originalbeschreibung der Primer: Strassburg *et al.*, 1997b)

2.1.12 Substrate

Von ICN, Irvine/USA wurden folgende Substrate bezogen:

- Benzanthrazen
- 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolin (IQ)
- 2-Amino-1-methyl-6-phenyl-1-H-imidazo [4,5-b] pyridin (PhIP)
- 3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido-[4,3-b]indolacetat (TrpP1)

Von Sigma, München wurde bezogen:

- 2-Acetylaminofluoren

Aus dem Midwest Research Institute, Kansas, Missouri/USA kamen folgende Substanzen:

- 7-Hydroxybenzo(α)pyren (7-OH-BaP)
- 8-Hydroxybenzo(α)pyren (8-OH-BaP)
- 9-Hydroxybenzo(α)pyren (9-OH-BaP)
- Benzo(α)pyren-trans-7,8-dihydrodiol (7-8-dOH-BaP)
- 3-Hydroxy-2-acetylaminofluoren (3-OH-AAF)
- 7-Hydroxy-2-acetylaminofluoren (7-OH-AAF)
- 2-Amino-3,8-dimethyl-imidazo [4,5-f] quinoxalin (MeIQX)
- 4-(N-Methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK)
- 4-(N-Methyl-N-nitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanal (NNA)

Von Toronto Research Chemicals, Toronto/Kanada kam:

- 2-Nitro-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin (N-Hydroxy-PhIP)

2.1.13 Standardpuffer

Phosphate buffered saline (PBS)

Na₂/KPO₄-Puffer:

0,5 M Na₂HPO₄

0,5 M KH₂PO₄

pH-Wert von Na₂HPO₄, auf pH 9 einstellen

mit 0,5 M KH₂PO₄ den pH-Wert auf 7,2 titrieren ($\approx 1/3$ KH₂PO₄)

Ansatz für 10 l PBS:

90 g NaCl

200 ml Na₂KPO₄-Puffer

ad 10 l mit Millipore H₂O auffüllen

aliquotieren und autoklavieren

6x Ladepuffer für Agarosegele:

15% Ficoll

0,25% Bromphenolblau

bzw. Xylencyanol

50x TAE-Puffer (1l)

242 g Tris base

51,1 ml Eisessig

100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

10x TE-Puffer

0,1 M Tris-Cl pH 8,0

10 mM EDTA

Puffer für SDS Gelelektrophorese und Western Blot

SDS Gele

Reagenz	12 % Trenngel	5 % Sammelgel
H ₂ O	3,3 ml	4,1 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml	-
1 M Tris/HCl pH 6,8	-	750 µl
Acrylamid/Bisacrylamid 29/1 (Rotiphoresegel 30, Roth, Karlsruhe)	4 ml	1 ml
10 % (w/v) SDS	100 µl	60 µl
10 % (w/v) APS	100 µl	60 µl
TEMED	4 µl	6 µl

Auftragspuffer (2x)

100 mM Tris pH 6,8

4% (w/v) SDS

20 % Glycerol

0,001 % Bromphenolblau

kurz vor Gebrauch zusetzen

5 % β-Mercaptoethanol

Elektrophoresepuffer

25 mM Tris

250 mM Glycin (pH 8,3)

0,1 % (w/v) SDS

Transferpuffer

3,03 g Tris

(frisch ansetzen)

14,41 g Glycin

800 ml Methanol

H₂O ad 1 l

Alkalischer Phosphatasepuffer	100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 100 mM Tris/HCl pH9,5
TBS-Tween	10 mM Tris/HCl pH 8,0 150 mM NaCl 0,05 % Tween
Blockierlösung	TBS-Tween + 5%Magermilchpulver
Mikrosomenpuffer	500 mM Tris pH 7,4 100 mM MgCl ₂

2.1.14 Reagenzien und Materialien für den UGT-Aktivitätstest

- L-Phosphatidylcholin, 1 mg/ml H₂O (Sigma, Deisenhofen)
- UDP-Glukuronsäure (UDPGA), 0,1 mM in H₂O (Sigma, Deisenhofen)
- Saccharolacton, (Sigma, Deisenhofen), 500 mM in H₂O
- ¹⁴C-UDP-Glukuronsäure (ICN, Irvine/USA), Konzentration: 925 kBq/ml
Ethanol/Wasser 2:8, spezifische Aktivität: 9,91 GBq/mmol
- Substrate als 5 mM Stammlösung in Methanol, Aceton oder DMSO gelöst
- Reaktionspuffer: 500 mM Tris-Cl pH 7,6, 100 mM MgCl₂
- Laufpuffer für TLC-Kammer: 35% Aceton, 35% n-Butanol, 10% Eisessig, 20% Wasser
- TLC-Platten (Whatman, Clifton, New Jersey/USA)

2.1.15 Nährmedien

LB-Medium (Luria Bertani)	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Bacto-Hefe-Extrakt 10 g/l NaCl, pH 7,5 mit 1M Tris einstellen, autoklavieren
LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin	LB-Medium mit 15 g/l Bacto- Agar, autoklavieren, auf ca. 60°C abkühlen lassen, vor dem Gießen 100 µg/ml Ampicillin zugeben
DMEM für HEK-293 Zellen	500 ml DMEM 50 ml FKS 2,5 ml Penicillin/ Streptomycin
DMEM für stabil transfizierte HEK-293 Zellen	450 ml DMEM 50 ml FKS 40 ml G418 (10 mg/ml) 2,5 ml Penicillin/ Streptomycin
RPMI 1640 für HepG2 Zellen	500 ml RPMI 1640 50 ml FKS 5 ml L-Glutamin 2,5 ml Penicillin/ Streptomycin
RPMI 1640 für KatoIII Zellen	450 ml RPMI 1640 100 ml FKS 5 ml L-Glutamin 2,5 ml Penicillin/ Streptomycin

2.2 METHODEN

2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Ein Milliliter einer DH5 α -Übernachtskultur wurde in 400 ml LB-Medium bei 37°C und 225 rpm inkubiert bis die Kultur nach etwa 4 Stunden eine OD_{595 nm} von 0,6 erreicht hatte. Anschließend wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und bei 3000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml kalter steriler CaCl₂-Lösung (60 mM CaCl₂, 15 % Glycerin, 10 mM PIPES pH 7,0) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach einmaliger Wiederholung dieses Schrittes wurde das Pellet in 10 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen, in 200 μ l Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

2.2.2 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Für die Transformation von Plasmid-DNA in kompetente DH5 α -Zellen wurde die Hitzeschock-Methode verwendet. Dazu wurden 10 ng Plasmid-DNA in 50 μ l CaCl₂-kompetente DH5 α -Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA in die Zellen erfolgte anschließend durch Inkubation der Zellen über einen Zeitraum von 30 s bei 42°C. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde der Ansatz 1 h bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit 100 μ g/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37° inkubiert.

2.2.3 Plasmid-Maxi-Präparation

Die Isolierung von DNA aus transformierten Zellen erfolgte mit Hilfe eines Plasmid-Maxi-Kits der Firma Quiagen, Hilden. Das Prinzip basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterien nach der Methode von Birnboim und Doly, 1979. Das Lysat wurde auf eine Anionenaustauschersäule gegeben. Die stark negativ geladenen Nukleinsäuren binden an das positiv geladene Säulenmaterial, während die weniger stark geladenen Proteine die Säule passieren. Zunächst wurde die RNA mit einem Puffer höherer Ionenstärke von der Säule gelöst, anschließend wurde die DNA-Fraktion durch weitere Erhöhung der Ionenstärke

von der Säule eluiert. Das Salz wurde durch Isopropanol und Ethanol wieder ausgefällt und die DNA schließlich in TE aufgenommen. Die Konzentration der Präparation wurde anschließend photometrisch bei 260 nm bestimmt. Bei einer Quarzkuvette mit einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 50 µg /ml doppelsträngiger DNA. Eine Information über die Reinheit der Probe liefert der Quotient aus OD 260 nm /OD 280 nm. Saubere Nukleinsäure-Präparationen ergaben Ratios zwischen 1,8 und 2.

2.2.4 Anlegen von Glycerinstocks

Zur dauerhaften Lagerung von transformierten Bakterien wurden 700 µl einer Bakterienkultur in logarithmischer Wachstumsphase mit 300 µl 80% Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

2.2.5 Passagieren von Zellen

Die Kultivierung aller benutzten Zelllinien erfolgte in einem Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ und 80 % Luftfeuchtigkeit. Die in Kultur gehaltenen Zellen wurden zweimal wöchentlich geteilt. Dazu wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen. Die HEK-293 Zellen wurden anschließend mit Zellkulturmedium vom Flaschenboden abgespült, im Verhältnis von 1:6 umgesetzt und mit Medium auf 10 ml aufgefüllt. Die HepG2 und die KatoIII Zellen wurden nach dem Waschen durch Inkubation mit 1,5 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Die KatoIII Zellen wurden anschließend in einem Verhältnis von 1:6 umgesetzt, die HepG2 Zellen im Verhältnis von 1:4.

2.2.6 Einfrieren und Lagerung von Zellen

Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen wie beim Passagieren abgelöst und 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und zunächst bei -80°C eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur Wiederverwendung gelagert.

2.2.7 Auftauen von Zellen

Das zum Einfrieren benutzte Medium enthielt 10 % DMSO, das bei aufgetauten Zellen zytotoxisch wirkt. Die eingefrorenen Zellen mussten daher schnell aufgetaut und in frisches Medium überführt werden. Nach Entnahme der Zellen aus dem Stickstofftank wurden sie im 37°C Wasserbad aufgetaut, in ein Röhrchen mit 10 ml des entsprechenden Kulturmediums überführt und 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine 75 cm² Kulturflasche ausgesät.

2.2.8 Transiente Transfektion von Zellen mit Hilfe von Liposomen

Zur Transfektion sollte die Konfluenz der Zellen etwa 60% sein. Dazu wurden 3 x 10⁵ Zellen in 35 mm Petrischalen ausgesät und 24 h inkubiert. Am Tag der Transfektion wurden pro Ansatz 5 µl Lipofectin-Reagenz mit 100 µl serumfreiem Medium gemischt und 45 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden 2 µg DNA und 100 µl Opti-MEM in neue Gefäße pipettiert. Dieser Ansatz wurde zu der Lipofectin-Opti-MEM Mischung gegeben und 15 min bei RT inkubiert, damit sich die DNA-Liposomen-Komplexe bilden konnten. Die Zellen wurden in der Zeit zweimal gewaschen, bevor die DNA-Liposomen-Komplexe zusammen mit 800 µl Opti-MEM dazupipettiert wurden. Die Aufnahme der DNA in die Zellen erfolgte über Nacht im CO₂-Inkubator bei 37°C. Anschließend wurde das serumfreie Medium durch das entsprechende serumhaltige Zellkulturmedium ersetzt. Das Ernten der Zellen erfolgte nach 48 h Inkubation bei 37°C.

2.2.9 In-situ-Färbung von β-Gal-transfizierten Zellen mit X-Gal

X-Gal-Lösung in PBS:

0,2 % X-Gal (aus 2% Stock in Dimethylformamid, DMF)

2 mM MgCl₂

5 mM K₄Fe(CN)₆ · 3H₂O

5 mM K₃Fe(CN)₆

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden Zellen mit 500 ng - 4000 ng des pSV- β -Galactosidase Kontrollvektors nach dem oben beschriebenen Protokoll transfiziert. Zum Fixieren der Zellen wurde Glutaraldehyd mit PBS in einer Endkonzentration von 0,25% frisch angesetzt. Die Zellen wurden vor der Fixierung zweimal mit PBS gewaschen und anschließend durch Inkubation mit 2 ml Glutaraldehyd/well 15 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die bei -20°C gelagerte X-Gal-Färbelösung wurde währenddessen im Wasserbad aufgetaut, die benötigte Menge wurde vor Gebrauch mit Hilfe eines $0,2\ \mu\text{m}$ Rundfilters steril filtriert. Die Zellen wurden mit 1 ml dieser Lösung bedeckt und bei 37°C inkubiert. Eine Blaufärbung der transfizierten Zellen war bei COS-7 Zellen bereits nach 45 min sichtbar, HepG2 und HEK-293 Zellen wurden 2 Stunden inkubiert, bis eine Färbung deutlich war. Der Farbstoff wurde anschließend wieder abgespült, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und zur längerfristigen Lagerung mit 1 ml 80% Glycerin überschichtet.

2.2.10 Herstellung stabil transfizierter Zelllinien

Stabil transfizierte Zelllinien weisen eine Integration der transfizierten Plasmid-DNA in ihr Genom auf. Dieses Ereignis kommt etwa mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-4} vor. Um ausschließlich diese Zellen zu vermehren, verwendet man ein antibiotikumhaltiges Selektionsmedium, das nur die Zellen überleben läßt, die Plasmid-DNA mit einem spezifischen Resistenzgen wie *neo* gegen das Antibiotikum Neomycin (G418) in ihr Genom integriert haben.

Die Menge des zugesetzten Selektionsmarkers hängt von der benutzten Zelllinie ab und muss vorher experimentell bestimmt werden. Dazu wurde eine $75\ \text{cm}^2$ Zellkulturflasche subkonfluenten HEK-293 Zellen im Verhältnis von 1:20 verdünnt, in Schalen mit $8,5\ \text{cm}\ \varnothing$ umgesetzt und mit neomycinhaltigem Zellkulturmedium in Konzentrationen von $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ bis $1000\ \mu\text{g}/\text{ml}$ bei 37°C 10 Tage inkubiert. Die Zellen mussten so dünn ausgesät werden, dass sie in der Zeit nicht mehr geteilt und neu ausplattiert werden brauchten. Das Selektionsmedium wurde alle drei bis vier Tage ersetzt. Die Konzentration, bei der gerade alle Zellen gestorben waren, wurde für die stabile Transfektion verwendet. Für die HEK-293 Zellen geschah dies bei $800\ \mu\text{g}/\text{ml}$ Neomycin (G418).

Zur stabilen Transfektion wurden 3×10^5 Zellen/well mit je 2 μg DNA transfiziert wie bei der transienten Transfektion. Das serumfreie Medium wurde zunächst durch Zellkulturmedium ersetzt, das wiederum nach 24 h gegen Selektionsmedium (Zellkulturmedium plus 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418) ausgetauscht wurde. Als Kontrollen dienten jeweils zwei wells nicht transfizierter HEK-293 Zellen; ein well wurde mit normalem Zellkulturmedium behandelt, das andere wie die transfizierten Zellen mit Selektionsmedium. Die Zellen wurden nicht umgesetzt, das Selektionsmedium jedoch alle zwei bis drei Tage gewechselt, um tote Zellen aus den wells zu entfernen. Nach etwa zwei Wochen waren alle nicht transfizierten Zellen tot, während transfizierte Zellen, die die Plasmid-DNA stabil in ihr Genom integriert hatten, überlebten und Zellklone bildeten. Die Position von isoliert liegenden Klonen wurde auf der Unterseite der Schale mit einem Stift markiert. Die Zellen wurden mit einer 10 μl Pipette vorsichtig abpipettiert und in eine 24-well Schale überführt. Für jedes Plasmid-Konstrukt wurden mindestens sechs verschiedene Klone ausgewählt. Sobald die Zellen in den wells konfluent waren, wurden die einzelnen Klone in jeweils drei wells geteilt. Die Zellen eines wells wurden weiter expandiert, die anderen beiden wurden zur Überprüfung der Zellklone verwendet (Herstellung von RNA aus den Zellen für einen Nachweis mit Hilfe der PCR und Herstellung von Zellextrakten für einen Aktivitätsassay). Positiv getestete Klone wurden weiter expandiert und zur langfristigen Sicherung in flüssigem Stickstoff gelagert. Insgesamt dauerte die Herstellung einer stabilen Zelllinie etwa fünf Wochen.

2.2.11 Lactatdehydrogenase (LDH)-Zytotoxizitätsassay

HEK-293 Zellen wurden in einer Konzentration von 2×10^4 Zellen/well einer 96-well Flachbodenplatte mit 200 μl G418-haltigem Zellkulturmedium ausgesät und 48 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit 100 μM des jeweiligen Substrates in 150 μl Assay-Medium (DMEM/1% FKS/800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418/Penicillin/Streptomycin) für weitere 24 h. (Die Substratkonzentrationen wurden zuvor experimentell bestimmt, dargestellt in Kapitel 3.2.3). Als Kontrolle für die spontane LDH-Abgabe von Zellen dienten unbehandelte Zellen. Nach der Inkubation wurden die Mikrotiterplatten 10 min bei 250 x g zentrifugiert. Vom zellfreien Überstand wurden 100 μl abgenommen und in eine neue

Mikrotiterplatte überführt. Der Nachweis der Zytotoxizität erfolgte mit Hilfe des Cytotoxicity Detection Kit (LDH) der Firma Roche, Mannheim. Dem Zellkulturüberstand wurden 100 µl eines Gemisches aus Katalysator (Diaphorase) und einem Substrat (Tetrazoliumsalz) nach Angaben des Herstellers zugesetzt und 30 min im Dunkeln inkubiert. LDH gelangte aus zytotoxischen Zellen in den Zellkulturüberstand. Es katalysierte dort die Oxidation von Lactat zu Pyruvat und reduzierte dabei NAD^+ zu $\text{NADH}+\text{H}^+$. Durch Übertragung dieser H^+ -Ionen auf das gelbliche Tetrazoliumsalz entstand rötliches Formazan. Die Menge des gebildeten Formazans korrelierte direkt mit der LDH-Enzymaktivität im Zellkulturüberstand. Formazan hat ein Absorptionsmaximum bei ca. 500 nm und konnte daher photometrisch mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 490 nm bestimmt werden. Als Referenzwellenlänge wurde 690 nm gewählt.

2.2.12 Proliferationsassay durch Bromdesoxyuridin (BrdU)-Einbau

In Flachbodenmikrotiterplatten wurden 2×10^4 Zellen/well in 200 µl Zellkulturmedium ausgesät und nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Karzinogenen in Konzentrationen von 10 - 100 µM behandelt. Zum Nachweis der Proliferation der Zellen wurde der Cell Proliferation ELISA, BrdU, der Firma Roche, Mannheim verwendet. Das BrdU wurde nach 24 h Inkubation der Zellen 1:1000 mit sterilem Zellkulturmedium verdünnt (Endkonzentration: 10 µM BrdU) und auf die Zellen gegeben. Während dieser Zeit wurde das Pyrimidinanalog anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurde das BrdU-haltige Medium wieder abgenommen und die Zellen mit einem Fixierungsreagenz des Kits 30 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Das Reagenz wurde anschließend durch vorsichtiges Schlagen der umgedrehten Platte auf saugfähiges Papier entfernt. Der Anti-BrdU-Antikörper wurde 1:100 mit dem im Kit mitgelieferten Inkubationspuffer verdünnt, auf die fixierten Zellen gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen, bevor als Substratlösung 100 µl/well Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben und 30 min inkubiert wurde. Der Peroxidase gekoppelte Anti-BrdU-Antikörper bewirkte einen blauen Farbumschlag des zugesetzten Substrats.

Die Intensität des Farbumschlags wurde photometrisch mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 370 nm bestimmt. Als Referenzwellenlänge wurden 490 nm eingestellt.

2.2.13 Apoptosefärbung mit Hilfe eines Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierten Caspase-Markers

In einer 24-well Platte wurden 5×10^4 Zellen/well ausgesät und 48 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Karzinogenen in einer Konzentration von 100 µM behandelt. Als Negativkontrollen dienten Zellen, die mit der Menge Methanol behandelt wurden, die bei den Karzinogenen als Lösungsmittel diente. Nach 24 h Inkubation im 37°C Brutschrank wurde das Medium abgenommen, der Caspase-FITC-Marker (CaspACE FITC-VAD-FMK-In Situ Marker, Promega, Heidelberg) in einer Endkonzentration von 10 µM mit Zellkulturmedium verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach 20 min Inkubation bei 37°C wurden die Platten bei 300 x g 5 min zentrifugiert, mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden schließlich in 100 µl PBS aufgenommen und auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger gegeben. Nach 5 min hatten sich die Zellen angeheftet. Die überschüssige Flüssigkeit wurde entfernt, die Zellen wurden in 10 % Formalin 30 min lichtgeschützt bei RT auf dem Objektträger fixiert, anschließend noch zweimal mit PBS gewaschen und mit 90 % Glycerin/ 10 % PBS eingedeckt. Der Nachweis von Apoptose erfolgte fluoreszenzmikroskopisch.

2.2.14 Isolierung von Zellkompartimentmembranen (Mikrosomen)

Für die Herstellung von Mikrosomen aus den stabil transfizierten Zellen wurden je Zelllinie zwei subkonfluent gewachsene 75 cm² Flaschen geerntet. Dazu wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen, in 1 ml/Flasche kaltem Mikrosomenpuffer aufgenommen und in ein vorgekühltes Glasgefäß (Potter-Elvehjam) überführt. Darin wurden die Zellen durch einen genau eingepassten rotierenden Teflonstab aufgeschlossen (Einstellung des Rotors: II, 5-6, Teflonstab in der Zellsuspension 8-10 mal auf- und abbewegen).

Es schlossen sich Differentialzentrifugationen an, die das Homogenat in mehrere Pellets und Überstände aufteilten. Das Lysat wurde zunächst auf 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und 5 min bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Im Pellet befanden sich Zelltrümmer und Zellkerne. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde das Pellet nochmal im 3-5-fachen Volumen Mikrosomenpuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem ersten kombiniert und das Pellet verworfen. Im zweiten Zentrifugationsschritt wurden Mitochondrien, Lysosomen und Zellmembranen pelletiert. Dazu wurde der Überstand aus den ersten Zentrifugationen auf 1 ml Zentrifugenröhrchen (Eppendorf) verteilt und 1 h bei 150.000 x g (Festwinkelrotor TL 100) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 100 µl Mikrosomenpuffer gelöst und bei -80°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte vor dem Einfrieren mit Hilfe eines Bradford-Proteinassays (Bio-Rad, München).

2.2.15 Quantifizierung von Proteinen nach Bradford

Das Absorptionsmaximum des Farbstoffs Coomassie Brilliant-Blau G-250 wird durch Bindung an Proteine in saurer Lösung von 465 auf 595 nm verschoben (Bradford, 1976). Je 1-5 µl der Proteinextrakte wurden mit Wasser auf 800 µl verdünnt, mit 1/5 Volumen des Farbstoffkonzentrats (Bio-Rad, München) versetzt und nach 2 min Inkubation im Spektrophotometer bei 595 nm gemessen. Durch einen Vergleich der gemessenen OD Werte mit einer zuvor erstellten Eichkurve definierter BSA Standards wurde der Proteingehalt der Probe ermittelt.

2.2.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Proteine eines Zellextrakts können in einem denaturierenden Polyacrylamidgel entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden (Laemmli, 1970).

Zunächst wurde dazu ein 12% Trenngel hergestellt und sofort zwischen zwei Glasplatten gegossen, bis es etwa 2/3 ihrer Höhe einnahm. Die Oberfläche wurde durch Überschichten mit n-Butanol geglättet. Nach Polymerisierung des Trenngels (30-60 min) wurde der Alkohol durch Whatmanpapier entfernt und das

Trenngel mit dem frisch pipettierten 5% Sammelgel bis zum oberen Plattenrand überschichtet. Anschließend wurde der Kamm zwischen die Glasplatten gesteckt. Nach Auspolymerisierung des Sammelgels wurden 20 µg Mikrosomen im Verhältnis von 1:2 mit Auftragspuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und in die Geltaschen pipettiert. Im Sammelgel wurden die Proben bei 20 mA fokussiert und im Trenngel bei 40 mA aufgetrennt. Der Lauf wurde beendet, wenn die Farbstofffront die untere Gelkante erreicht hatte.

2.2.17 Western Blot

Bei der von Burnette 1980 entwickelten Methode werden die im SDS Gel aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Membran übertragen und können dort mit Hilfe von markierten spezifischen Antikörpern detektiert werden. Mit Hilfe eines Skalpells wurden die Glasplatten vorsichtig getrennt und das Sammelgel abgeschnitten. Eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran sowie 6 Lagen Whatmanpapier wurden auf Größe des Sammelgels zugeschnitten. Die Membran wurde 5 s in Methanol getränkt und anschließend zusammen mit dem Whatmanpapier und dem Vlies der Blottingapparatur 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Blot wurde luftblasenfrei wie folgt geschichtet:

Vlies, 3 Lagen Whatmanpapier, Trenngel, Membran, 3 Lagen Whatmanpapier, Vlies. Anschließend wurde er so in die Blottingapparatur eingespannt, dass die Membran zum positiven Pol (Anode) der Elektrophoresekammer zeigte und das Gel zum negativ geladenen Pol (Kathode), damit die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe beim Anlegen der Spannung in die Membran geblottet werden konnten. Das Blotten erfolgte bei 4°C über Nacht (16 h) bei einer konstanten Einstellung von 100 mA. Nach Abbau des Blots wurde die Membran 1 h bei RT in TBS-Tween, 5% Magermilchpulver blockiert, dreimal mit frischem TBS-Tween gewaschen und anschließend mit dem ersten Antikörper 1 h bei RT inkubiert.

Nicht gebundener Antikörper wurde anschließend in 3 Waschschritten mit TBST entfernt, bevor die Membran mit dem 2. Antikörper für eine weitere Stunde bei RT inkubiert wurde. Anschließend wurde wieder dreimal 5 min mit TBST gewaschen und einmal 10 min mit alkalischem Phosphatasepuffer.

Der Nachweis des durch die Antikörper detektierten mikrosomalen UGT1A Proteins erfolgte durch Inkubation mit 10 ml alkalischem Phosphatasepuffer, 66 µl

NBT (Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid), 33 μ l BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) (Promega, Heidelberg) ca. 15 min bei RT, bis die Banden sichtbar wurden. Die Reaktion wurde mit H₂O gestoppt, die Membran zwischen Whatmanpapier getrocknet und gelagert.

2.2.18 Isolierung von mRNA aus Zellen

Zur Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen wurde ein Kit der Firma Roche, Mannheim verwendet. Dabei wurden die Zellen bei gleichzeitiger Inaktivierung von RNasen durch einen Triton-X-100-haltigen Puffer lysiert. Anschließend wurde das Lysat auf eine Säule gegeben. Die Nukleinsäuren binden hier in Gegenwart eines chaotropen Salzes spezifisch an die Silica-Oberflächen des Säulenmaterials (Vogelstein und Gillespie, 1979). Reste kontaminierender DNA wurden durch eine DNase I-Inkubation eliminiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die RNA mit sterilem Wasser eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Extinktion von 1 entsprach bei einer Messküvette von 1 cm einem Gehalt von 40 μ g/ml RNA. Die Reinheit der isolierten RNA wurde anhand des Quotienten der Optischen Dichte von 260 nm /280 nm bestimmt. Werte von 1,8 - 2,0 wiesen auf einen hohen Reinheitsgrad der Probe hin.

2.2.19 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Bei dieser Methode wurden 3 μ g der isolierten Gesamt-RNA aus Zellen in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dazu wurden Oligo-dTs als Primer verwendet, die an den Poly-A-Schwanz der RNA binden. Als Enzym für diese Reaktion diente die Superscript Reverse Transkriptase (Gibco BRL), eine modifizierte Transkriptase des *Moloney murine leukemia virus* (MMLV-RT). Die Transkription erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers bei 42°C.

2.2.20 Duplex Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Diese Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase wurde erstmals von Saiki *et al*, 1985 beschrieben.

Für den Nachweis spezifischer UGT1A-Isoformen in den transfizierten HEK-293 Zellen dienten 2 µl der hergestellten cDNA (1/10 des Ansatzes) als Vorlage. Dabei wurden einzelne UGT1A-Sequenzen zusammen mit einer Sequenz des ubiquitär vorkommenden β-Aktin-Gens amplifiziert. Der β-Aktin-Primer wurde so gewählt, dass er Sequenzen aus dem Übergang von Exon 4/Intron 5 und Intron 5/Exon 5 amplifiziert. Mit einer cDNA-Vorlage entsteht durch Herausfallen der Intronsequenz ein 202 bp Produkt, während Verunreinigungen durch genomische DNA zu einem 312 bp Produkt führen. Auf diesem Weg war in der anschließenden Visualisierung im Gel eine Kontamination durch genomische DNA ausschließbar. Durch das Koamplifizieren von UGT1A- und β-Aktin-cDNA konnte die hier beschriebene Methode sowohl für quantitative als auch für qualitative Transkriptanalysen eingesetzt werden. Alle Primer wurden als Stammlösungen mit ddH₂O in einer Konzentration von 100 µM gelöst. Daraus wurden Gebrauchslösungen in einer Konzentration von 10 µM angesetzt. Die einzelnen mRNAs der UGT Isoformen wurden unter den folgenden Bedingungen amplifiziert:

Zusammensetzung der Puffer:

- 10x Thermopol-Puffer (NEB, Schwalbach): 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCL pH 8,8, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)SO₄
- 10x Mg-freier Puffer (Promega, Heidelberg): 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCL pH 9,0, 1% Triton X-100.
- 10x Taq PufferB (Promega, Heidelberg): 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM KCl, 0,1mM EDTA, 1 mM DTT, 50% Glycerol, 0,5 % Nonidet P40, 0,5% Tween 20.

Reagenz	UGT1A1, 1A6	UGT1A3, 1A4, 1A5	UGT1A7, 1A8, 1A9, 1A10
ddH₂O	71 µl	63 µl	72 µl
Puffer	10 x ThemopolPuffer	10 x Mg-freier Puffer	10 x ThemopolPuffer
	10 µl	10 µl	10 µl
Salz	MgSO ₄ , 100 mM	MgCl ₂ , 25 mM	-
	1 µl	10 µl	
dNTP, 10 mM each	2 µl	2 µl	2 µl
Vorwärts-Primer, 10 µM	5 µl	5 µl	5 µl
Rückwärts-Primer, 10 µM	5 µl	5 µl	5 µl
cDNA	2 µl	2 µl	2 µl
Polymerase	Vent (exo-)	Taq (Puffer B)	Vent (exo-)
	2 µl	1 µl	2 µl
Vorwärts-Aktinprimer, 10 µM	1 µl	1 µl	1 µl
Rückwärts-Aktinprimer, 10 mM	1 µl	1 µl	1 µl
PCR-Bedingungen	94°C-3'; (94°C-45''; 58°C-45'' ;72°C-45'') x 32 Zyklen; 72°C-7'; 4°C-∞	94°C-3'; (94°C-45''; 56°C-45'' ;72°C-45'') x 32 Zyklen; 72°C-7'; 4°C-∞	94°C-3'; (94°C-45''; 65°C-45'' ;72°C-45'') x 33 Zyklen; 72°C-7'; 4°C-∞
Zugabe Aktinprimer nach	6 Zyklen	8 Zyklen	7 Zyklen

2.2.21 Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur Überprüfung der in der PCR amplifizierten Sequenzen wurde 1/10 des PCR-Ansatzes auf ein 2% Agarosegel aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 90 V wanderten die DNA-Moleküle aufgrund ihrer Molekülmasse im elektrischen Feld unterschiedlich schnell. Die Größenbestimmung der Fragmente erfolgte anhand eines mitgelaufenen 100 bp-Standards. Die Banden wurden anhand einer Ethidiumbromidfärbung des Gels (0,5 µg/ml) unter UV-Licht visualisiert und fotografiert.

2.2.22 Katalytische Aktivität von UDP-Glukuronosyltransferasen (UGT-Aktivitätstest)

Dieser Test wurde erstmalig von Bansal und Gessner, 1980 beschrieben und von Matern *et al.*, 1994 modifiziert.

Bei Verwendung von Zellextrakten wurden die Zellen bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert und in 200 µl Reaktionspuffer aufgenommen. Durch Ultraschall (Einstellung: 10 s, 10%) wurden die Zellen auf Eis aufgeschlossen und genomische DNA zerstört, so dass die Zellsuspension anschließend besser pipettierbar war. Die Konzentration des Proteingehalts erfolgte mit Hilfe des Bradford-Proteinassay-Reagenz (Biorad, München).

Reagenz	Menge
Reaktionspuffer	10 µl
UDPGA	19 µl
Phosphatidylcholin	10 µl
Saccharolacton	17 µl
Substrat	2 µl
UGT-Protein	50 µg ad 38 µl mit ddH ₂ O auffüllen
¹⁴ C-UDP Glukuronsäure	4 µl

Zur enzymatischen Bildung der Glukuronide wurde der Ansatz 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl 100 % Ethanol auf Eis gestoppt, dabei lösen sich die Glukuronide im Ethanol. Die Proben wurden anschließend 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Ethanol wurde in einer Vakuumzentrifuge entweder bei RT über Nacht oder bei 45°C für 3 h verdampft. Eine Glaskammer zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Glukuronide wurde zuvor mit Whatmanpapier an den Seiten ausgelegt und der Boden mit ca. 1,5 cm Laufpuffer bedeckt. Das Lyophilisat wurde in 40 µl Methanol gelöst und auf eine Dünnschichtchromatographieplatte 2 cm - 3 cm vom unteren Rand aufgetragen. Nach dem vollständigen Eintrocknen der Proben auf der Platte wurde diese in die vorbereitete Kammer gestellt. Die Kammer wurde durch Vaseline mit einer Glasplatte luftdicht abgeschlossen, so dass die Glukuronide im Lösungsmittel unter einer Lösungsmitteldampfathmosphäre aufgetrennt wurden. Der Tank wurde erst wieder zur Entnahme der TLC-Platte geöffnet, wenn die Laufmittelfront den oberen Plattenrand erreicht hatte (nach 3 - 4 h). Die Platte wurde an der Luft 15 min getrocknet, in Folie eingewickelt und 15 h in einer Kassette mit einer Phosphoimagerplatte exponiert. Die aufgetrennten ¹⁴C-markierten Glukuronide konnten anschließend autoradiographisch mit Hilfe eines Phosphoimagers dargestellt werden.

2.2.23 Durchflusszytometrische Messungen von FITC- und Propidiumiodid-gefärbten Zellen

Mit einem Caspase-FITC-Marker (Promega, Heidelberg) lassen sich apoptotische Zellen darstellen. Propidiumiodid ist ein stark basisches Reagenz, das bei nekrotischen Zellen mit geschädigter Zellmembran gut in den sauren Zellkern eindringen kann und sich dort in die helicale Struktur der DNA einlagert.

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung von Apoptose und Nekrose wurden 3×10^5 Zellen/well in 6-well Schalen ausgesät und 48 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Behandlung der Zellen mit je 100 µM verschiedener Substrate in 1 ml Zellkulturmedium für weitere 24 h. Als Negativkontrollen dienten jeweils unbehandelte Zellen.

Nach der Inkubation wurden die Zellen von den Schalen abgelöst und jedes well wurde in 4 Ansätze mit je 250 μ l aufgeteilt:

- a) Keine Färbung; Zellen wurden nicht weiter behandelt
- b) Nekrosefärbung; Propidiumiodid in einer Endkonzentration von 4 μ g/ml dem Ansatz zugegeben
- c) Apoptosefärbung: Caspase-FITC-Marker in einer Endkonzentration von 10 μ M zugegeben
- d) Doppelfärbung: Propidiumiodid/Caspase-FITC-Marker in den gleichen Konzentrationen wie oben zugegeben

Alle Ansätze wurden 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und das Pellet schließlich in PBS/2%FKS aufgenommen. Die Messung erfolgte in dem Durchflußzytometer FACScan (Becton-Dickinson, San Jose, USA). Nach Bestimmung eines geeigneten Fensters wurden darin pro Messung 10000 Ereignisse gezählt. Nach der Aquisition der Ergebnisse wurden anhand der Positivkontrollen (Einzelfärbungen) und Negativkontrollen (ungefärbte Zellen) individuelle Quadranten für die einzelnen Parameter festgelegt. Der Anteil der Zellen in einem Quadrant wurde als prozentualer Anteil der insgesamt 10000 gezählten Ereignisse ausgewertet.

3. ERGEBNISSE

3.1 ETABLIEREN EINES ZELLKULTURMODELLS FÜR ZYTOPROTEKTIONSSTUDIEN

3.1.1 Auswahl einer geeigneten Zelllinie

Stabil transfizierte Zellen bieten die Möglichkeit, unter gut kontrollierbaren Bedingungen die Wirkung exogener Einflüsse auf Zellen zu untersuchen. Zelllinien, die selektiv einzelne Isoformen der *UGT1A*-Genfamilie exprimieren, lassen sich für funktionelle Studien einsetzen, in denen gezielt eine Zytoprotektion einzelner *UGT1A*-Isoformen gegenüber substratexponierten Zellen untersucht wird. Zum Etablieren eines solchen Zellkulturmodells musste eine Zelllinie ausgewählt werden, die keine endogene *UGT*-Aktivität besitzt und die effizient transfizierbar ist.

Dazu wurde zunächst die *UGT1A*-mRNA-Expression verschiedener Zelllinien bestimmt. Aus 1×10^6 Zellen bzw. 300 mg Lebergewebe wurde Gesamt-RNA isoliert. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurden 3 μg zum Umschreiben in cDNA mittels reverser Transkriptase eingesetzt. 1/10 des cDNA-Ansatzes wurde als Vorlage (template) zur Amplifikation von Transkripten der verschiedenen *UGT1A*-Isoformen benutzt. 1/10 des PCR-Ansatzes wurde auf einem 2% Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die spezifischen Banden konnten durch Ethidiumbromidfärbung an einem UV-Schirm sichtbar gemacht werden (Abbildung 3.1).

In der Leber wird das in früheren Studien gezeigte organspezifische Expressionsprofil aus *UGT1A1*, *UGT1A3*, *UGT1A4*, *UGT1A6* und *UGT1A9* auf hohem Niveau exprimiert (Strassburg et al., 1999a). Im Gegensatz dazu zeigte sich in den HEK-293 Zellen eine schwach detektierbare Expression von *UGT1A3*-, *UGT1A4*- und *UGT1A9*-mRNA und in den HepG2 Zellen keine *UGT1A*-mRNA-Expression.

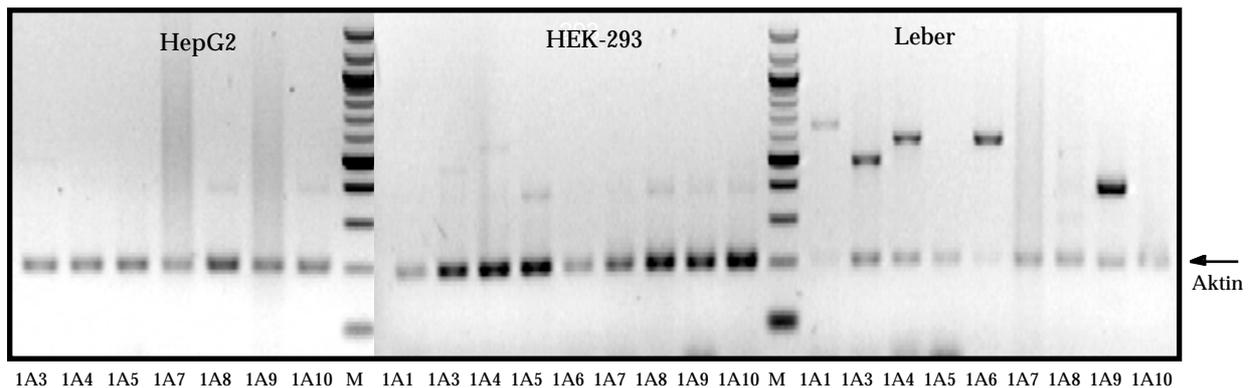


Abb. 3.1: Endogene UGT-Expression von HepG2 Zellen, HEK-293 Zellen und Lebergewebe

Aus HepG2 und HEK-293 Zellen und aus humaner Leber wurde RNA isoliert, die zur Analyse der UGT1A-mRNA-Expression durch Exon-spezifische PCR eingesetzt wurde. Als Kontrolle wurde bei jedem Ansatz ein 200 bp großes β -Aktin Fragment als „house keeping gene“ koamplifiziert. Ein 100 bp Marker wurde als Längenstandard mit aufgetrennt. In der Leberprobe konnte die gewebetypische Expression von UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6 und UGT1A9 gezeigt werden. In den HEK-293 Zellen wurden UGT1A3 und UGT1A4 schwach exprimiert, während in den HepG2 Zellen keine endogene UGT-Expression nachweisbar war.

Aufgrund der oben gezeigten PCR-Ergebnisse sollte nun untersucht werden, ob die schwache mRNA-Expression in HEK-293 Zellen auch funktionell als enzymatische UGT-Aktivität nachweisbar ist. Dies kann durch die Glukuronidierung von spezifischen Substraten dieser Proteine direkt experimentell gezeigt werden. Dazu wurde je 50 μ g Zellextrakt aus HEK-293, HepG2 und KatoIII Zellen mit spezifischen Substraten und mit ^{14}C -markierter UDP-Glukuronsäure 1 h bei 37°C inkubiert. Die gebildeten ^{14}C -markierten Glukuronide der verwendeten Substrate wurden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und autoradiographisch durch Phosphoimager Detektion visualisiert und dokumentiert. Abbildung 3.2 zeigt die Glukuronidierung verschiedener Substrate durch KatoIII, HepG2 und HEK-293 Zellen. Die KatoIII Zellen dienten als Kontrolle, da sie noch über signifikante Glukuronidierungsaktivität verfügen (Strassburg *et al.*, 1998a). Während die KatoIII Zellen alle benutzten Substrate glukuronidieren konnten, war weder bei den HepG2 noch bei den HEK-293 Zellen eine Enzymaktivität für typische UGT-Substrate nachweisbar. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die minimale UGT-mRNA-Expression der HEK-293 Zellen nicht ausreicht, um eine Glukuronidierung von Substraten experimentell nachzuweisen. Für die Herstellung stabiler Transfektanden, die einzelne UGT-Isoformen überexprimieren, eigneten sich daher sowohl die HepG2 als auch die HEK-293 Zellen als Zelllinien für Protektionsexperimente.

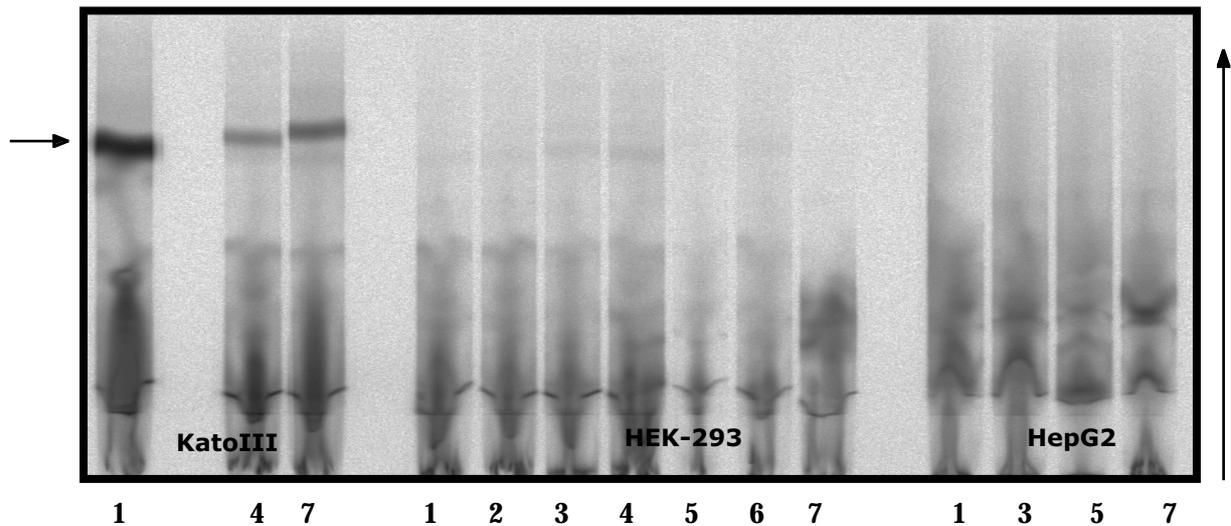


Abb. 3.2: Endogene UGT-Aktivität von KatoIII, HepG2 und HEK-293 Zellen

50 µg Protein aus Zellextrakten wurde mit ^{14}C -markierter UDP-Glukuronsäure inkubiert. Die gebildeten Glukuronide wurden auf einer Dünnschichtchromatographieplatte aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht. In den KatoIII Zellen sind für alle benutzten Substrate Glukuronide sichtbar, in den HEK-293 Zellen als auch in den HepG2 Zellen nicht. Der vertikale Pfeil zeigt die Auftrennrichtung der Glukuronide an, der horizontale die gebildeten Glukuronide.

1: 1-Naphtol, 2: 4-Hydroxybiphenyl, 3: 4-Methylumbelliferon, 4: Para-Nitrophenol, 5,6: Amitryptilin, 7: 7-Hydroxybenzo(α)pyren.

Ein Einfluss der transfizierten Menge eines UGT-cDNA-Expressionsplasmids auf die Glukuronidierungsaktivität war bereits im Vorfeld mit COS-7 Zellen durchgeführt worden. Die Zellen waren dazu mit verschiedenen Mengen von UGT1A1- und UGT1A6-cDNA-Konstrukten in einem Bereich von 250 - 4000 ng DNA transfiziert worden. Die Glukuronidierungsaktivität wurde anschließend durch Inkubation der Zellextrakte mit dem Substrat Para-Nitrophenol und ^{14}C -markierter UDP-Glukuronsäure bestimmt. Abbildung 3.3 zeigt beispielhaft für die Expression von UGT1A6 einen linearen Anstieg der Aktivität mit zunehmender Plasmidmenge. Basierend auf diesen Vorversuchen wurde die anschließende Transfektion von HEK-293 und Hep-G2 Zellen in einem Konzentrationsbereich von 500 bis 4000 ng Plasmid-DNA durchgeführt.

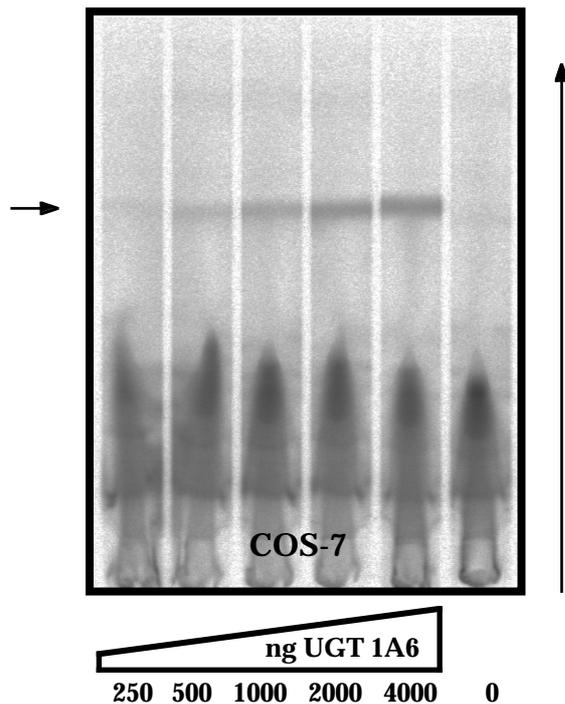


Abb. 3.3: Konzentrationsabhängige UGT-Aktivität von UGT1A6-transfizierten COS-7 Zellen

COS-7 Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen (250, 500, 1000, 2000, 4000 ng) des pcDNA/UGT1A6-Expressionskonstrukts transfiziert. Ihre Glukuronidierungsaktivität wurde anschließend mit dem Substrat Para-Nitrophenol im Aktivitätsassay überprüft. Als Negativkontrolle (0) dienten COS-7 Zellen, die mit 1000 ng des pcDNA-Leervektors transfiziert wurden.

Die Effizienz der Transfizierbarkeit sollte durch Transfektion verschiedener Mengen eines pSV- β -Galactosidase-Kontrollvektors überprüft werden.

Dazu wurden HepG2, HEK-293 und COS-7 Zellen mit verschiedenen Mengen DNA transfiziert. Nach 48 h Inkubation der Zellen bei 37°C wurden sie mit X-Gal gefärbt. Zellen, die β -Gal-DNA aufgenommen hatten, konnten anhand ihrer Blaufärbung im Mikroskop identifiziert werden. Abbildung 3.4 zeigt ein repräsentatives Transfektionsergebnis verschiedener Zelllinien.

In den Transfektionsexperimenten zeigte sich, dass sowohl die verwendeten COS-7 Zellen als auch die HepG-2 und die HEK-293 Zellen sich gut transfizieren ließen und damit eine weitere Voraussetzung zur Herstellung stabiler Transfektanden besaßen. Für die folgenden Experimente wurden ausschließlich die HEK-293 Zellen verwendet. Dafür sprachen die folgenden experimentellen Gründe: Im Gegensatz zu den COS-7 Zellen handelt es sich bei den HEK-293 Zellen um eine humane Zelllinie, in der humane UGT1A-Genprodukte exprimiert werden sollten. Als embryonale Zellen weisen die HEK-293 eine zwei- bis dreimal höhere

Zellteilungsrate auf als die humane Hepatom-Zelllinie HepG2 (nach eigenen Erfahrungen und dokumentiert in der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig). Für HEK-293 Zellen sind bereits erfolgreiche stabile Transfektionen mit Charakterisierung der katalytischen Aktivität der Expressionskonstrukte publiziert worden (Cheng *et al.*, 1999). Aufgrund der in Abb. 3.3 und 3.4 gezeigten Ergebnisse wurde zur Herstellung stabiler Transfektanten eine Plasmidkonzentration von 2 µg eingesetzt.

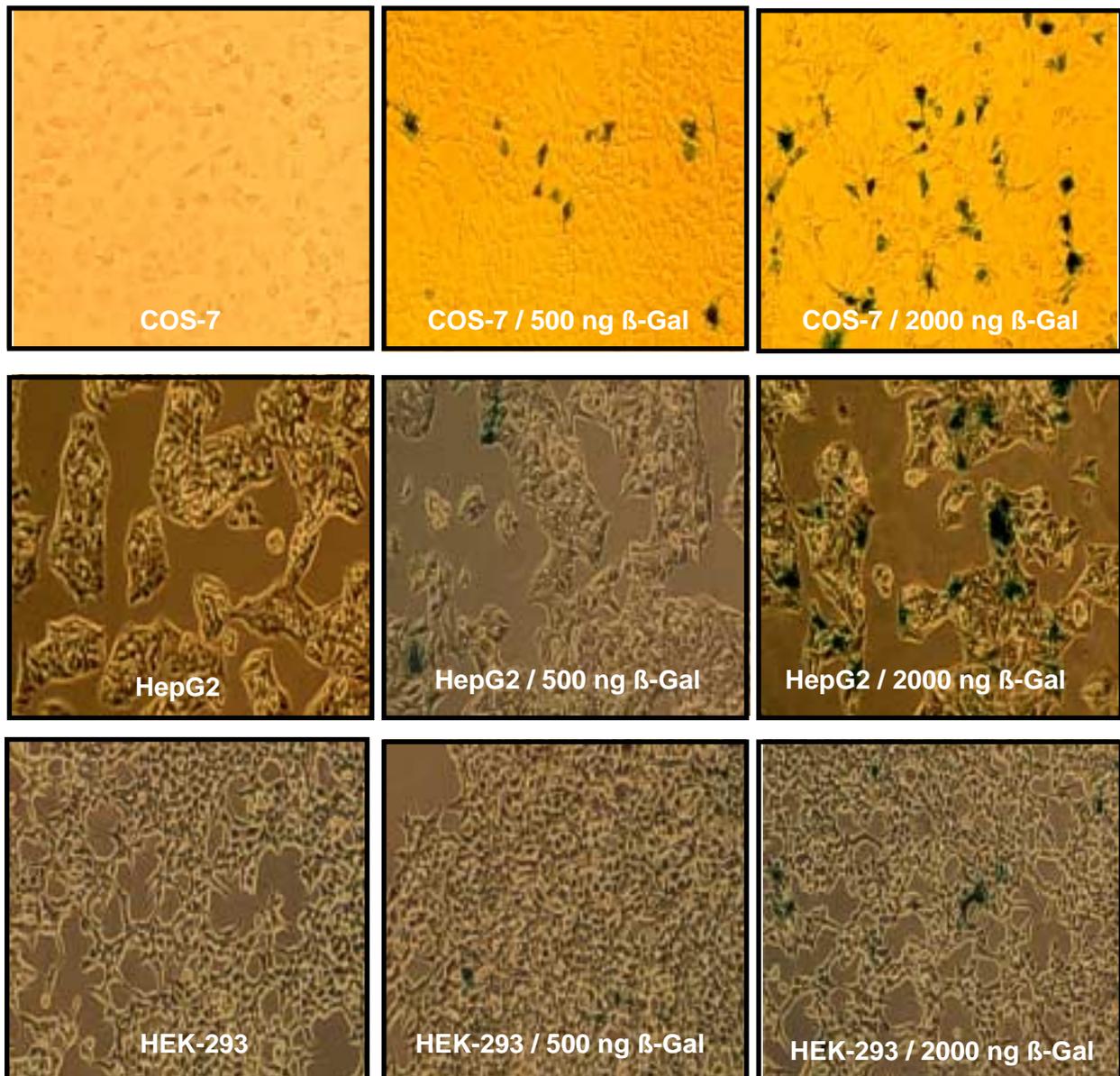


Abb. 3.4 Darstellung der Transfektionseffizienz von COS-7, HepG2 und HEK-293 Zellen

COS-7, HepG2 und HEK-293 Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen des Plasmids pSV- β -Gal transfiziert. Dargestellt ist eine Auswahl aus untransfizierten, mit 500 ng und mit 2000 ng β -Gal transfizierten Zellen. Diese Zellen lassen sich mit X-Gal blau färben. Die Originalvergrößerung für die photographischen Aufnahmen entspricht 100x.

3.1.2 Titration des Selektionsmediums für die stabile Transfektion

Die Selektion transfizierter Zellen, die das Plasmid in ihr Genom integriert haben, erfolgt durch Zugabe eines Antibiotikums, gegen das stabil transfizierte Zellen aufgrund eines Resistenzgens im Plasmid geschützt sind. Die Konzentration des Antibiotikums musste vor der Transfektion für die verwendete Zelllinie experimentell optimiert werden.

Dazu wurde eine 75 cm² Flasche subkonfluenten HEK-293 Zellen im Verhältnis von 1:20 geteilt und in Petrischalen mit 8,5 cm Durchmesser verteilt. Diese wurden mit dem Antibiotikum G418 in Konzentrationen von 100 bis 1000 µg/ml Zellkulturmedium inkubiert. Nach 10 Tagen wurde die Anzahl der überlebenden Zellen lichtmikroskopisch bestimmt. Es konnte eine lineare Abnahme der überlebenden Zellen mit steigender Konzentration des Antibiotikums festgestellt werden (nicht dargestellt). Bei einer G418-Konzentration von 800 µg/ml Zellkulturmedium starben alle Zellen, so dass diese Konzentration für die nachfolgende stabile Transfektion der Zellen ausgewählt wurde.

3.1.3 Herstellung von stabilen UGT1A-exprimierenden HEK-293 Zelllinien

Stabile Zelllinien bieten die Möglichkeit, eine protektive Funktion einzelner UGT-Isoformen zu untersuchen. Es sollten daher HEK-293 Zellen hergestellt werden, die jeweils eine UGT1A-Isoform selektiv exprimieren. Dazu wurden 3×10^5 Zellen mit je 2 µg eines UGT-Expressionsplasmids transfiziert und durch Zugabe von 800 µg/ml G418 in das Zellkulturmedium selektiert. Im Verlauf von zwei Wochen starben alle Zellen, die das transfizierte Plasmid nicht in ihr Genom integriert hatten. Die überlebenden Zellen bildeten Zellklone, die einer weiteren Selektionsrunde zugänglich waren. Abb. 3.5 zeigt einen G418-resistenten Zellklon.

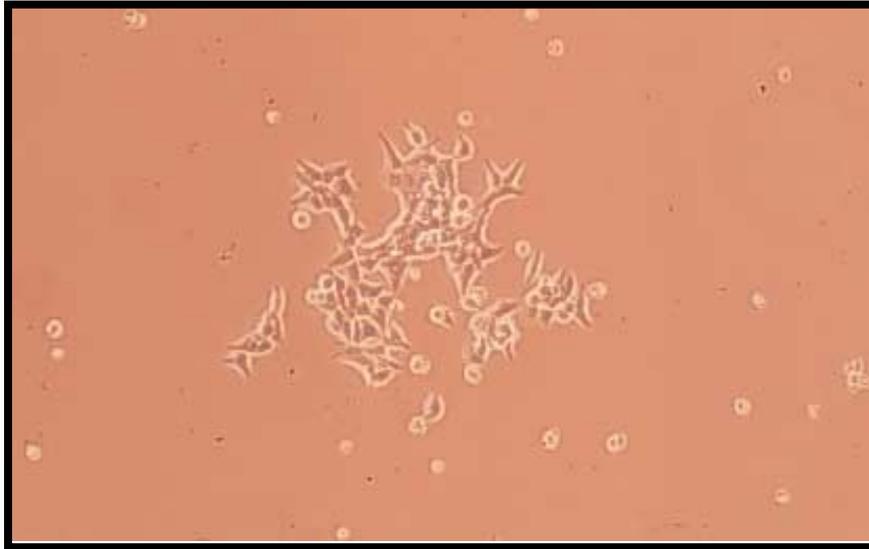


Abb. 3.5: Darstellung eines Zellklons nach Selektion stabil transfizierter Zellen

Die Abbildung zeigt einen Zellklon, der durch Integration des transfizierten pcDNA3.1*neo*-Plasmids resistent gegen das zugesetzte Antibiotikum G418 wurde.

Von jeder transfizierten UGT-Isoform wurden aus mehreren Zellklonen Zellen isoliert und expandiert. Anschließend wurde die erfolgreiche Transfektion der Zellen auf Transkriptebene mit Hilfe der PCR nachgewiesen. Die Aktivität der Klone wurde, wie zuvor dargestellt, im enzymatischen UGT-Aktivitätsassay überprüft. Die Analyse auf der Transkriptebene mit Exon 1-spezifischen Primern ist wichtig, da die Identität der einzelnen UGT-Isoformen aufgrund überlappender Substratspezifität im Aktivitätsassay nicht sicher zu definieren ist. Beispiele der UGT-Expression auf Transkript- und auf funktioneller Ebene sind in Abb. 3.6 und 3.7 gezeigt. Für die nachfolgenden Experimente wurden nur Klone ausgewählt, die sowohl in der PCR als auch im Aktivitätsassay eine Bande zeigten. Dies waren im Falle der Abb. 3.6 und 3.7 die Klone UGT1A9 K und UGT1A10 F.

Klone, die dieses Screening erfolgreich durchlaufen hatten, wurden weiter expandiert und bis zu ihrer Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Abbildung 3.8 zeigt eine Duplex-PCR von den erfolgreich hergestellten Zellklonen, die für die nachfolgenden Assays verwendet wurden. Die Expression individueller UGT-Proteine sollte mit Hilfe eines Western Blots nachgewiesen werden. Dazu wurden aus den transfizierten Zellen Mikrosomen isoliert. Jeweils 20 µg mikrosomaler Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Diese wurde zunächst mit einem humanen LKM3-positiven Antiserum und anschließend mit einem HRP-gekoppelten

Zweitantikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte über eine Farbreaktion mit alkalischer Phosphatase. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem Leervektor pcDNA transfiziert waren. Bis auf UGT1A10 ließen sich alle transfizierten UGTs mit dem LKM3-positiven Antikörper im Western Blot nachweisen (Abbildung 3.9). UGT1A10 konnte als schwache Bande mit einem Kaninchen α -UGT-Antikörper nachgewiesen werden. (Nicht gezeigt).

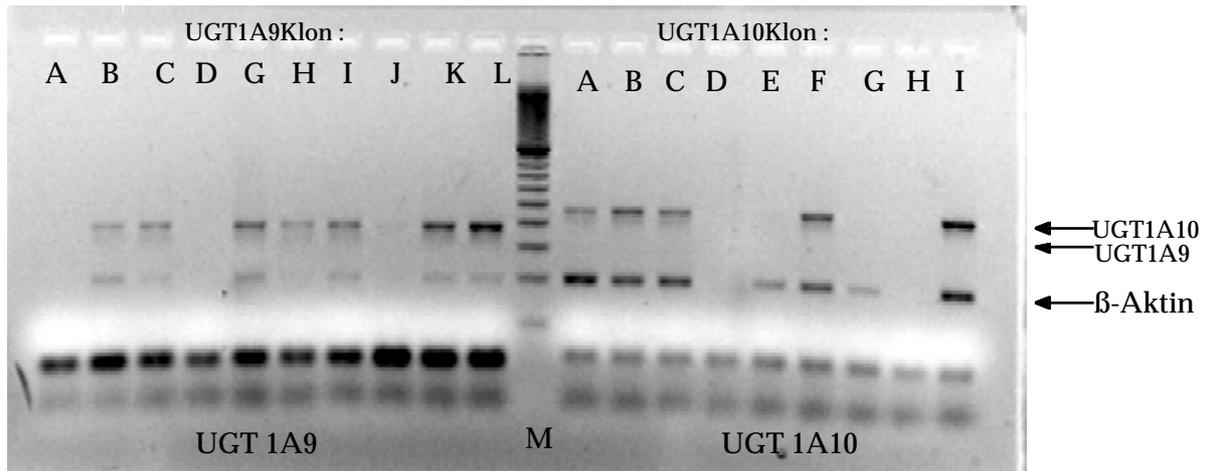


Abb. 3.6: Überprüfung der Zellklone mittels PCR am Beispiel von UGT1A9 und UGT1A10

Die Abbildung zeigt die Produkte einer Duplex-PCR der mRNA der UGT1A9- und UGT1A10-Zellklone mit den spezifischen UGT-Primern und mit β -Aktin-Primern, die bei korrekt umgeschriebener RNA in cDNA ein 200 bp-Produkt amplifizieren. Es wird deutlich, dass nicht alle isolierten Klone die spezifischen UGT1A9- oder UGT1A10-mRNAs exprimieren. Außerdem zeigen sich Unterschiede im Expressionsniveau der einzelnen Klone bei gleichen experimentellen Bedingungen.

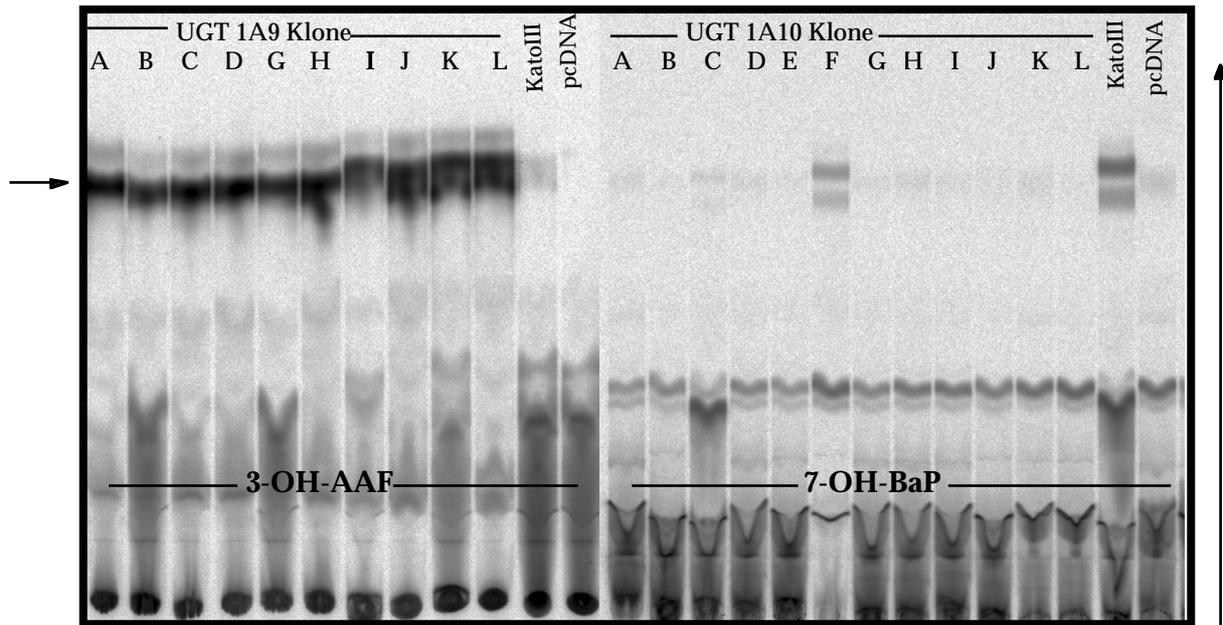


Abb. 3.7: Überprüfung der Aktivität der Zellklone von UGT1A9 und UGT1A10

Dargestellt ist ein Autoradiogramm der Glukuronidierung spezifischer Substrate von UGT1A9 und UGT1A10. Die UGT1A9-Klone zeigen alle eine Glukuronidierungsaktivität gegenüber dem Substrat 3-Hydroxy-2-acetylaminofluoren (3-OH-AAF), während von den UGT1A10-Klonen nur Klon F eine Aktivität gegenüber 7-Hydroxybenzo(α)pyren (7-OH-BaP) zeigt. Als Kontrollen wurden UGT-exprimierende KatoIII Zellen verwendet und HEK-293 Zellen, die mit dem Leervektor pcDNA transfiziert wurden. Der vertikale Pfeil stellt die Auftrennrichtung der Glukuronide dar, der horizontale die gebildeten Glukuronide.

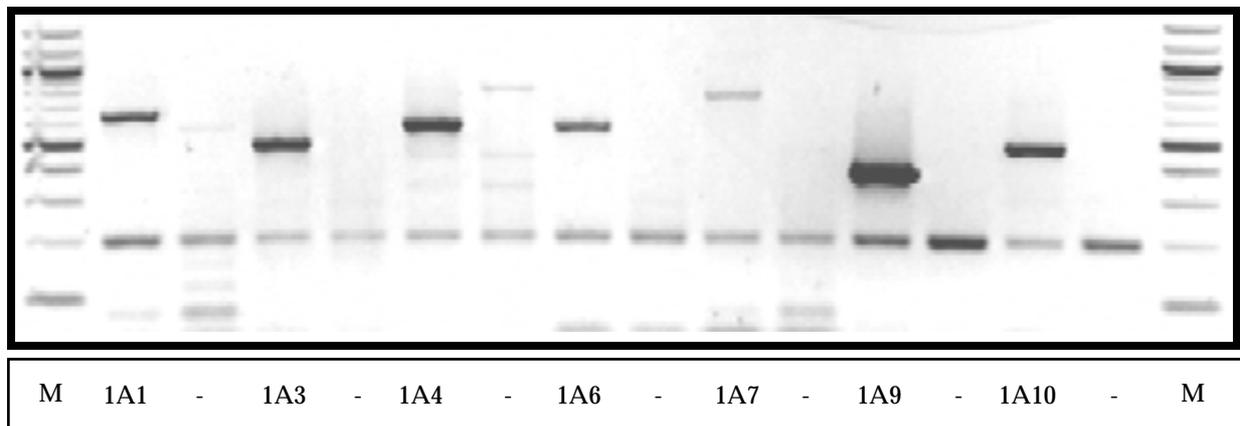


Abb. 3.8: Darstellung einer Duplex-RT-PCR aller verwendeten stabilen Zellklone

Die Abbildung zeigt eine Duplex-RT-PCR der ausgewählten stabil transfizierten HEK-293 Zellen. Die einzelnen UGT1A-Klone wurden mit den spezifischen UGT1A-Primern amplifiziert. Als Negativkontrolle (-) dienten HEK-293 Zellen, die mit dem Leervektor pcDNA transfiziert wurden.

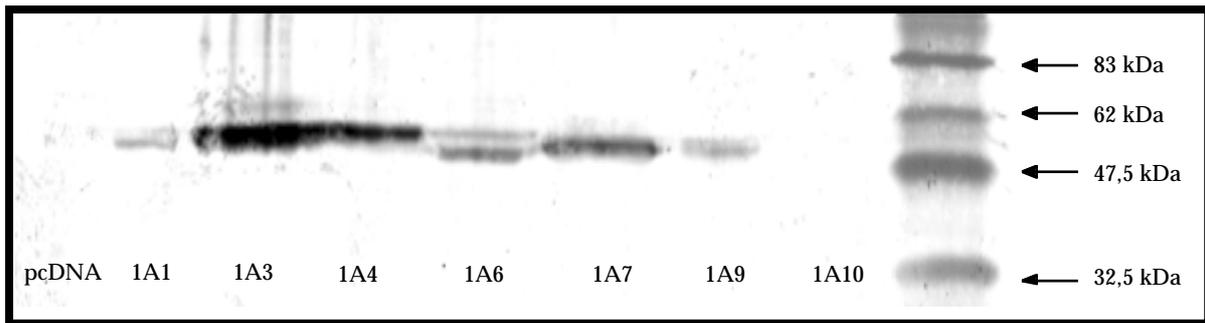


Abb. 3.9 Nachweis der UGT-Expression im Western Blot

Je 20 µg mikrosomaler Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, immobilisiert, mit einem humanen LKM3-positiven Antiserum inkubiert und mit Hilfe eines HRP-konjugierten Zweitantikörpers mit alkalischer Phosphatase detektiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur mit dem Leervektor pcDNA transfiziert waren. UGT1A10-transfizierte Zellen ließen sich mit diesem Serum nicht nachweisen. Mit einem Kaninchen α -UGT-Antikörper ließ sich eine schwache Bande nachweisen (nicht gezeigt).

3.2. OPTIMIERUNG DER ZELLKULTUR IM MIKROTITERMASSSTAB FÜR ZYTOTOXIZITÄTSSTUDIEN

3.2.1 Bestimmung der optimalen Zellzahl für den LDH-Assay

Im LDH-Assay kann die Zytotoxizität von substratbehandelten Zellen photometrisch bestimmt und relativ quantifiziert werden. Da verschiedene Zelllinien unterschiedliche Mengen an LDH enthalten, muss die Anzahl der ausgesäten Zellen für jede Zelllinie vorher bestimmt werden. Als optimal gilt dabei eine Zellzahl, bei der die Differenz aus der gemessenen maximalen und der spontanen LDH-Freisetzung am größten ist.

Zur Bestimmung dieser Zellzahl wurden in die ersten wells einer Mikrotiterplatte je 1×10^5 Zellen in 200 µl Zellkulturmedium ausgesät und im Verhältnis von 1:2 weiterverdünnt. Nach 24 h Inkubation der Zellen bei 37°C wurde das Medium abgenommen und bei der einen Hälfte der Zellen durch Assaymedium (1%FCS-haltiges Zellkulturmedium) ersetzt. Die andere Hälfte wurde mit Assaymedium inkubiert, das 1% Triton-X enthielt. Nach weiteren 24 h Inkubation bei 37°C wurden je 100 µl Zellkulturüberstand entnommen und mit 100 µl Tetrazoliumsalz als Nachweisreagenz inkubiert. Über die dadurch ausgelöste Azofarbstoffreaktion konnte die LDH-Freisetzung photometrisch bei 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm bestimmt werden.

In Abb. 3.10 wird die graphische Auswertung der LDH-Zytotoxizitätsversuche dargestellt. Für jeden Messwert wurden 3-fach-Bestimmungen durchgeführt. Ab einer Konzentration von 5×10^4 Zellen überschritten die Absorptionswerte der Triton-X-behandelten Zellen die maximale Detektionsgrenze des Photometers. Nachdem es bei einer zunächst ausgesäten Zellzahl von 4×10^4 Zellen/well wiederholt zu Messwerten außerhalb der Detektionsgrenze gekommen war, wurde die Anzahl der Zellen auf 2×10^4 /well reduziert. Die nachfolgenden Experimente basieren daher auf einer Zellzahl von 2×10^4 ausgesäten Zellen/well.

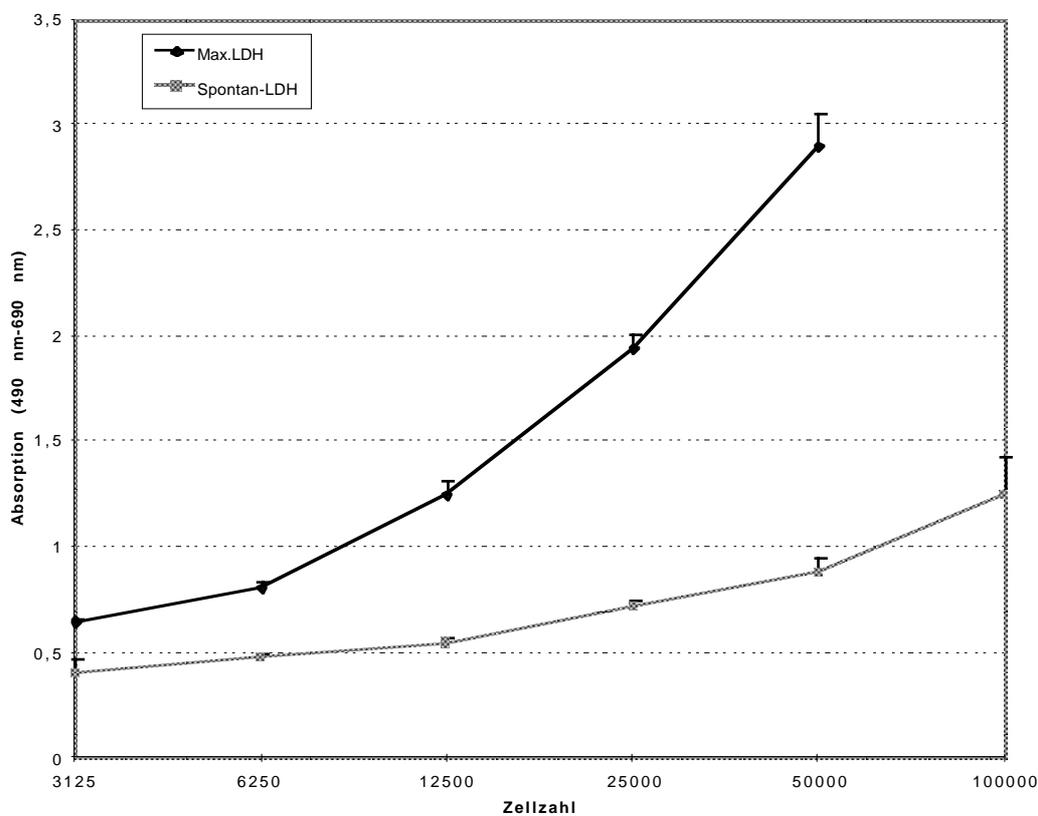


Abb. 3.10: Darstellung der optimalen Zellzahl im LDH-Assay

Zur Zellzahlbestimmung im LDH-Assay wurden 1×10^5 Zellen in Mikrotiterplatten ausgesät und im Verhältnis von 1:2 weiterverdünnt. Dargestellt ist die maximale LDH-Freisetzung Triton-X-behandelter Zellen und die spontane LDH-Freisetzung unbehandelter Zellen. Als optimale Zellzahl ergibt sich hieraus ein Bereich von $2,5$ bis 5×10^4 Zellen/well.

3.2.2 Bestimmung der Substrat-Expositionszeit

Zur Untersuchung des Einflusses der Behandlungsdauer auf die Zytotoxizität wurden die ausgesäten Zellen unterschiedlich lange mit 50 μM verschiedener Karzinogene inkubiert. Nach 4, 7, 10, 24, 54 und 78 Stunden wurde den Zellen 100 μl Zellkulturüberstand entnommen und bei 4°C gelagert. Nach 78 Stunden wurde mit allen gesammelten Überständen ein LDH-Assay durchgeführt. In Abbildung 3.11 ist die Zytotoxizität einer 7-Hydroxybenzo(α)pyren-Exposition für untransfizierte HEK-293 Zellen, für UGT1A9-transfizierte und für UGT1A10-transfizierte HEK-293 Zellen dargestellt.

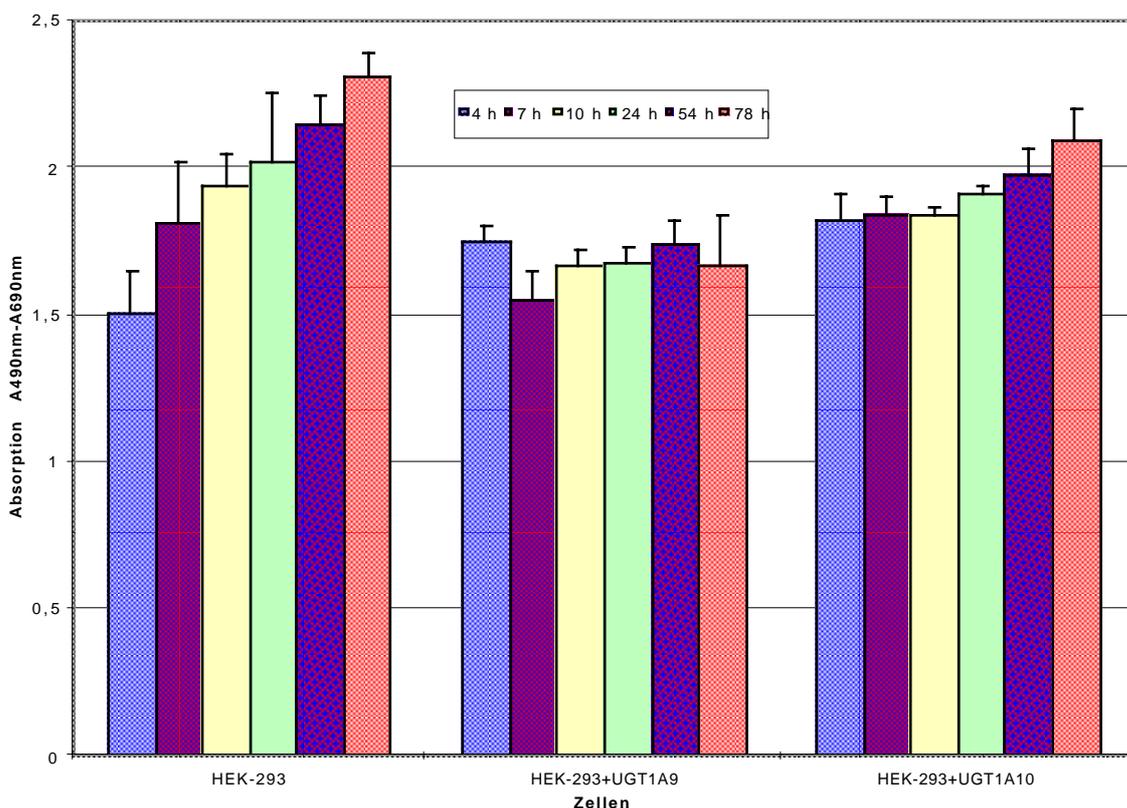


Abb. 3.11: Einfluss der Substrat-Expositionsszeit auf die Zytotoxizität

Untransfizierte HEK-293 Zellen und UGT1A9- bzw. UGT1A10- transfizierte HEK-293 Zellen wurden unterschiedlich lange (4, 7, 10, 24, 54 und 78 Stunden) mit 50 μM 7-Hydroxybenzo(α)pyren inkubiert. Die Zytotoxizität des Substrats in Abhängigkeit von der Expositionsdauer wurde im LDH-Assay bestimmt. Bei nicht transfizierten Zellen steigt die Zytotoxizität mit der Expositionsdauer, bei UGT1A10-transfizierten Zellen steigt sie leicht, bei UGT1A9-transfizierten Zellen ist keine zeitabhängige Zunahme erkennbar.

3.2.3 Bestimmung der Substratkonzentration

Eine Bewertung der zytoprotektiven Funktion einzelner UGT-Isoformen bei substratbehandelten Zellen setzt eine messbare Schädigung der behandelten Zellen durch die Substrate voraus. Die zytotoxische Wirkung der verwendeten Karzinogene sollte zunächst konzentrationsabhängig ermittelt werden. Die Zellen wurden dazu mit je 5, 10, 20, 50, 100 und 200 μM der Substrate für 24 h inkubiert. Die Zytotoxizität wurde anhand der LDH-Freisetzung photometrisch bestimmt. Abbildung 4.12 zeigt das Ergebnis als Mittelwert von jeweils 4-fach-Bestimmungen. Eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität war für die Substrate PhIP, N-Hydroxy-PhIP, für die Hydroxybenzo(α)pyrene (7-, 8- und 9-OH-BaP) und für MelQX deutlich nachweisbar. Bei den anderen Substraten überstieg die im LDH-Assay nachweisbare Zytotoxizität nicht die spontane LDH-Freisetzung unbehandelter Zellen.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Vorversuche wurden die nachfolgenden LDH-Assays nun unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 2×10^4 ausgesäte Zellen wurden 24 h mit 100 μM der verschiedenen Substrate exponiert.

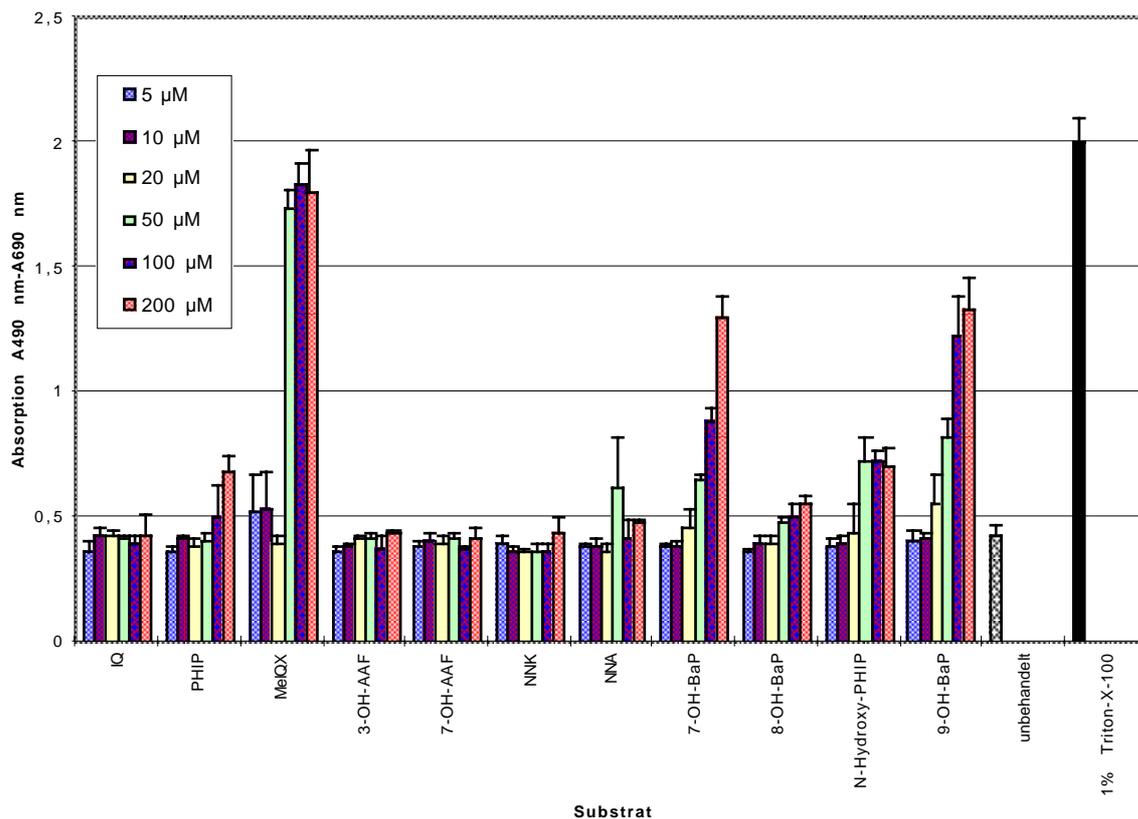


Abb. 3.12: Darstellung der konzentrationsabhängigen Zytotoxizität verschiedener Substrate

Gezeigt ist die graphische Auswertung von LDH-Zytotoxizitätsassays untransfizierter HEK-293 Zellen, die mit Substraten in den Konzentrationen von 5, 10, 20, 50, 100 und 200 µM für 24 h inkubiert wurden. Die Spontan-LDH-Freisetzung wurde durch unbehandelte Zellen bestimmt, der maximale LDH-Ausstoß durch 1% Triton-X-behandelte Zellen. Abkürzungen für die Substrate: **IQ** (2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolin); **PhIP** (2-Amino-1-methyl-6-phenyl-1-H-imidazo [4,5-b] pyridin); **MelQX** (2-Amino-3,8-dimethyl-imidazo [4,5-f] quinoxalin); **3-OH-AAF** (3-Hydroxy-2-acetylaminofluoren); **7-OH-AAF** (7-Hydroxy-2-acetylaminofluoren); **NNK** (4-(N-Methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon); **NNA** (4-(N-Methyl-N-nitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanal); **7-OH-BaP** (7-Hydroxybenzo(α)pyren); **8-OH-BaP** (8-Hydroxybenzo(α)pyren); **N-Hydroxy-PHIP** (2-Nitro-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin); **9-OH-BaP** (9-Hydroxybenzo(α)pyren)

3.3. PRÜFUNG DER ZYTOPROTEKTION DURCH SELEKTIVE EXPRESSION INDIVIDUELLER UGT1A-PROTEINE

3.3.1 Nachweis im LDH-Assay

Unter den oben optimierten Bedingungen sollte nun im Mikrotitermassstab getestet werden, ob einzelne UGT1A-Proteine in der Lage sind, bei den mit ihnen transfizierten Zellen die Zytotoxizität einzelner karzinogener Substrate zu verringern. Dazu wurden 2×10^4 UGT1A-exprimierende Zellen in

Mikrotiterplatten ausgesät und mit je 100 µM Substrat behandelt. Nach 24 h wurde die Zytotoxizität der Zellen anhand ihres LDH-Ausstößes photometrisch bestimmt. Um trotz zu erwartender Messwertschwankungen eine valide Aussage treffen zu können, wurden für die einzelnen Substrate und Transfektanden mindestens drei unabhängige Messungen mit je vier- bzw. sechsfach-Bestimmungen durchgeführt. Die so erhobenen Daten demonstrierten, dass durch selektive Überexpression von UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A7, UGT1A9 und UGT1A10 eine protektive Wirkung gegenüber PhIP-Exposition zu erreichen war. UGT1A4-exprimierende Zellen, die mit MelQX behandelt wurden, zeigten eine signifikant ($p < 0,05$) geringere Zytotoxizität als Zellen, die nur den Leervektor pcDNA exprimierten. Für UGT1A3-exprimierende Zellen konnte eine signifikant niedrigere Zytotoxizität nach Behandlung mit 7-OH-AAF gezeigt werden. In Abbildung 3.13 ist die Zytotoxizität der substratbehandelten Transfektanden als x-facher Wert unbehandelter Transfektanden dargestellt.

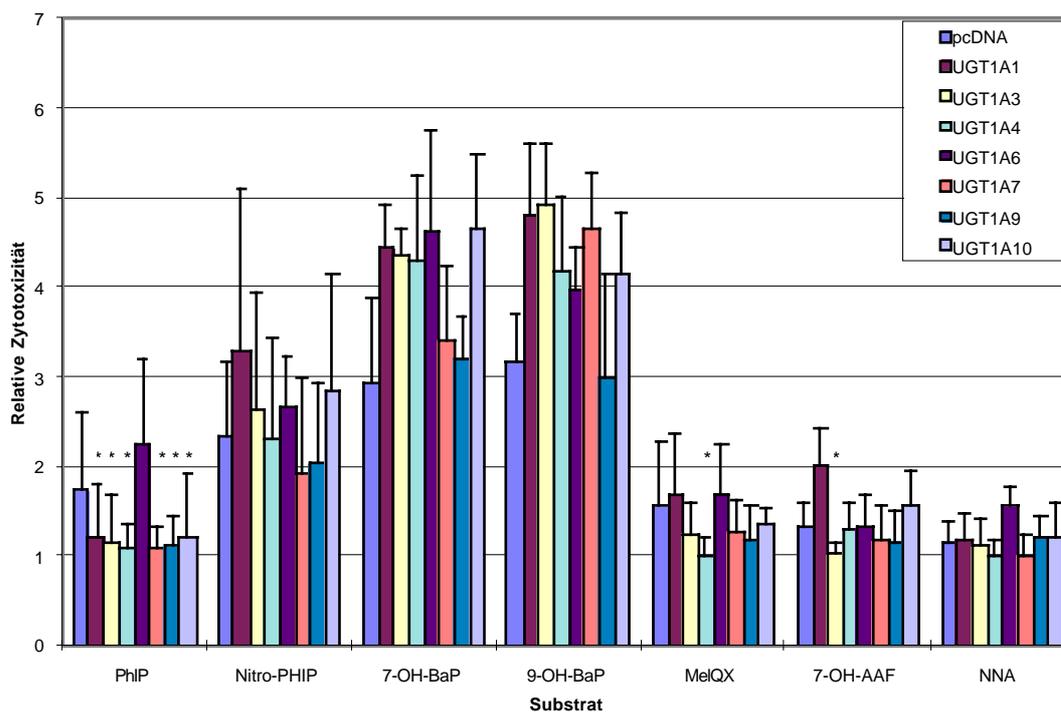


Abb. 3.13 : Substratvermittelte Zytotoxizität im LDH-Assay

Stabil UGT-transfizierte HEK-293 Zellen wurden mit je 100 µM verschiedener Substrate behandelt. Die Zytotoxizität der Zellen wurde nach 24 h im LDH-Assay bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 Messungen mit Standardabweichung (mindestens 3 unabhängige Messungen mit je 4-bzw. 6-fach-Bestimmungen). Die Zytotoxizität der einzelnen Transfektanden ist dargestellt als x-facher Wert der jeweiligen unbehandelten Transfektanden. Die mit * gekennzeichneten Transfektanden zeigten eine signifikant niedrigere Zytotoxizität als die mit dem Leervektor pcDNA transfizierten Zellen (Zweiseitiger Student's T-Test, $p < 0,05$).

3.3.2 Untersuchung der Zellproliferation im Bromdesoxyuridin (BrdU)-Assay

Neben der in Abschnitt 3.3.1 gezeigten zytotoxischen Wirkung der eingesetzten Substrate auf die HEK-293 Zellen sollte ihre Wirkung auf die Proliferation der Zellen untersucht werden. Diese wurde durch Zugabe von 10 μM BrdU bestimmt, das an Stelle von Thymidin zum Einbau in replizierende DNA verwendet wird. Die eingebaute Menge und damit das Ausmaß der Replikation wurde durch einen Peroxidase (POD)-gekoppelten α -BrdU-Antikörper bestimmt, der durch Katalyse des Substrats Tetramethylbenzidin (TMB) eine Farbreaktion hervorruft und einen photometrischen Nachweis erlaubt.

Zunächst mussten für den Proliferationsassay die Bedingungen bezüglich Zellzahl, BrdU-Inkubationsdauer und Antikörperinkubationsdauer optimiert werden. Dazu wurden in Mikrotiterplatten verschiedene Zellzahlen von 1×10^5 Zellen/well bis zu 5×10^2 Zellen/well ausgesät. Nach 24 h Wachstum der Zellen wurde ihnen BrdU zugegeben, das für 2, 4 und 24 h im Zellkulturmedium belassen wurde. Die BrdU-Inkorporation wurde nach Inkubation mit einem POD-gekoppelten α -BrdU-Antikörper mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 370 nm photometrisch detektiert (Abbildung 3.14). Für Zellzahlen von 10000 bis 50000 Zellen/well steigt die Proliferation mit der Anzahl von Zellen und der BrdU-Inkubationsdauer linear an. Für die nachfolgenden Versuche wurden 40000 Zellen 24 h mit BrdU inkubiert.

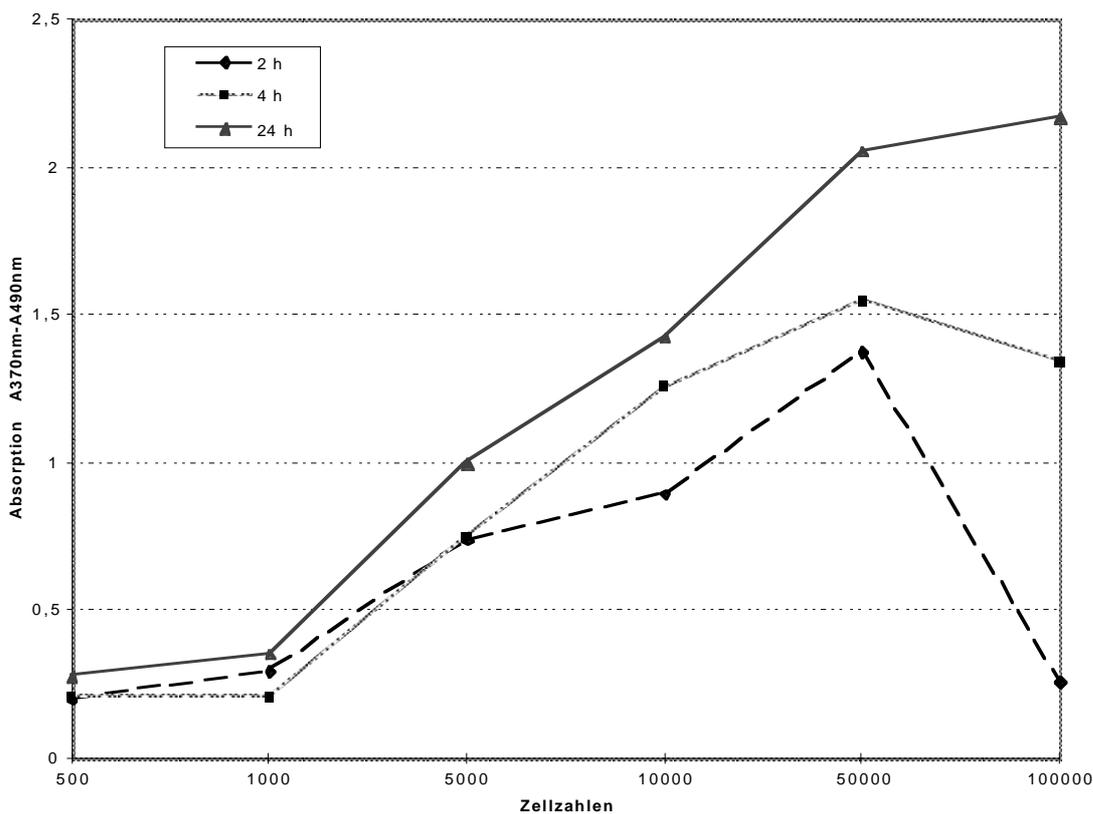


Abb. 3.14: Bestimmung von Zellzahl und BrdU-Inkubationsdauer für den Proliferationsassay

Zur Bestimmung der optimalen Assaybedingungen wurden Zellzahlen und BrdU-Inkubationszeiten variiert. Eine messbare Proliferation der Zellen wurde mit 10000 bis 50000 Zellen/well erreicht.

Unter den oben optimierten Bedingungen sollte nun die Wirkung der im LDH-Assay verwendeten Karzinogene auf die Zellproliferation untersucht werden. Dazu wurden 40000 stabil transfizierte HEK-293 Zellen/well ausgesät und mit 100 μ M Karzinogen-Substrat 24 h behandelt. Der BrdU-Einbau erfolgte während der nächsten 24 h. Die photometrischen Messwerte sind mit Fehlerindikatoren in Abbildung 3.15 dargestellt. Während bei 2-Amino-1-methyl-6-phenyl-1-H-imidazo [4,5-b] pyridin (PhIP)-, 2-Amino-3,8-dimethyl-imidazo [4,5-f] quinoxalin (MelQX)-, 7-Hydroxy-2-acetylaminofluoren (7-OH-AAF)- und 4-(N-Methyl-N-nitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanal (NNA)-behandelten Zellen die Zellproliferation weitgehend unverändert bleibt, sinkt sie bei 2-Nitro-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin (N-Hydroxy-PhIP)-, 7-Hydroxybenzo(α)pyren (7-OH-BaP)- und 9-Hydroxybenzo(α)pyren (9-OH-BaP)-behandelten Zellen sehr stark ab. Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit denen aus dem LDH-Assay in Kapitel 3.3.1. Die Substrate 7- und 9-OH BaP bewirken eine starke Zytotoxizität im

LDH-Assay und eine starke Verringerung der Proliferation im BrdU-Assay. Bei den N-Hydroxy-PhIP-behandelten Zellen ist die Proliferation ähnlich niedrig wie die der Hydroxybenzo(α)pyren-behandelten Zellen, während die N-Hydroxy-PhIP-vermittelte Zytotoxizität geringer ist als die Hydroxybenzo(α)pyren-vermittelte. PhIP-behandelte Zellen zeigen keine Veränderung ihrer Proliferationsrate, während ihre Zytotoxizität im LDH-Assay zunimmt. Für keines der eingesetzten Substrate konnte eine signifikante Zunahme der Proliferation gegenüber unbehandelten Zellen nachgewiesen werden. UGT1A-Protein-exprimierende Zellen zeigten ebenfalls gegenüber Zellen, die mit dem Leervektor pcDNA transfiziert wurden, keine signifikante Zunahme der Proliferation.

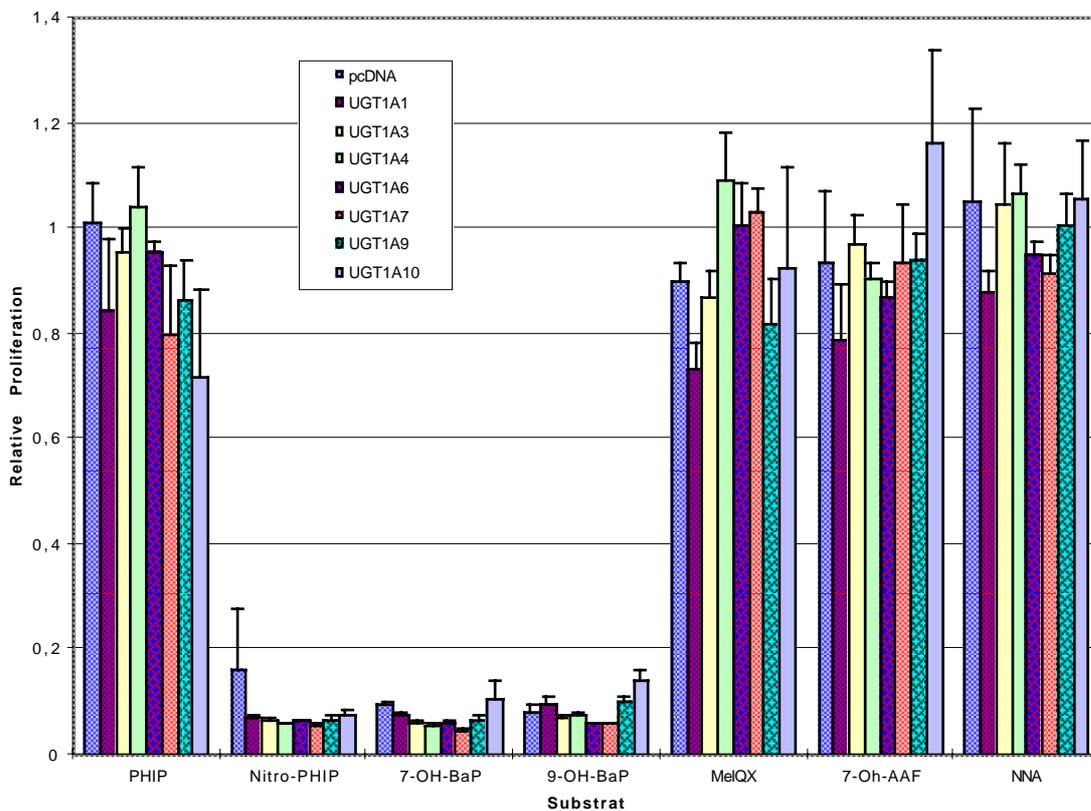


Abb. 3.15: Proliferation von Xenobiotika-behandelten Zellen im BrdU-Assay

Mit verschiedenen UGT1A-Isoformen transfizierte HEK-293 Zellen wurden mit je 100 μ M Substrat behandelt. Ihre Proliferation wurde nach 24 h Substratexposition und 24 h BrdU-Inkubation photometrisch bestimmt. Die Proliferation einzelner Transfektanten ist als x-facher Wert der Proliferation der entsprechenden unbehandelten Transfektanten dargestellt.

3.3.3 Detektion von Apoptose nach Karzinogen-Exposition der UGT1A-exprimierenden Zellen

Zelltod kann sowohl durch Nekrose der Zellen entstehen als auch durch Apoptose. Als zusätzlicher Endpunkt der Substratwirkung auf die Zellen sollte deren Apoptoseverhalten untersucht werden. Dazu wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät und nach 48 h bei 37°C Inkubation mit 100 μ M der Substrate für weitere 24 h behandelt. Apoptotische Zellen wurden durch Inkubation mit einem CaspACE FITC-VAD-FMK In-Situ-Marker (Promega, Heidelberg) detektiert. Nach Übertragen der Zellen auf einen Objektträger konnten sie fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden. Dabei zeigte sich, dass bei PhIP-behandelten Zellen keine Zunahme der Apoptose nachweisbar war. Eine Behandlung mit 7-Hydroxybenzo(α)pyren führte allerdings zu einer deutlichen Aktivierung von Caspasen und damit zu einer fluoreszenzmikroskopisch nachweisbaren Erhöhung der Apoptose. Zwischen UGT1A-exprimierenden Zellen und nicht UGT1A-exprimierenden Zellen zeigten sich bezüglich des Apoptoseverhaltens keine Unterschiede. Die in diesem Versuch durch Hydroxybenzo(α)pyren-Exposition induzierte Apoptose war daher nicht von der Expression individueller UGT1A-Genprodukte abhängig (Abb. 3.16).

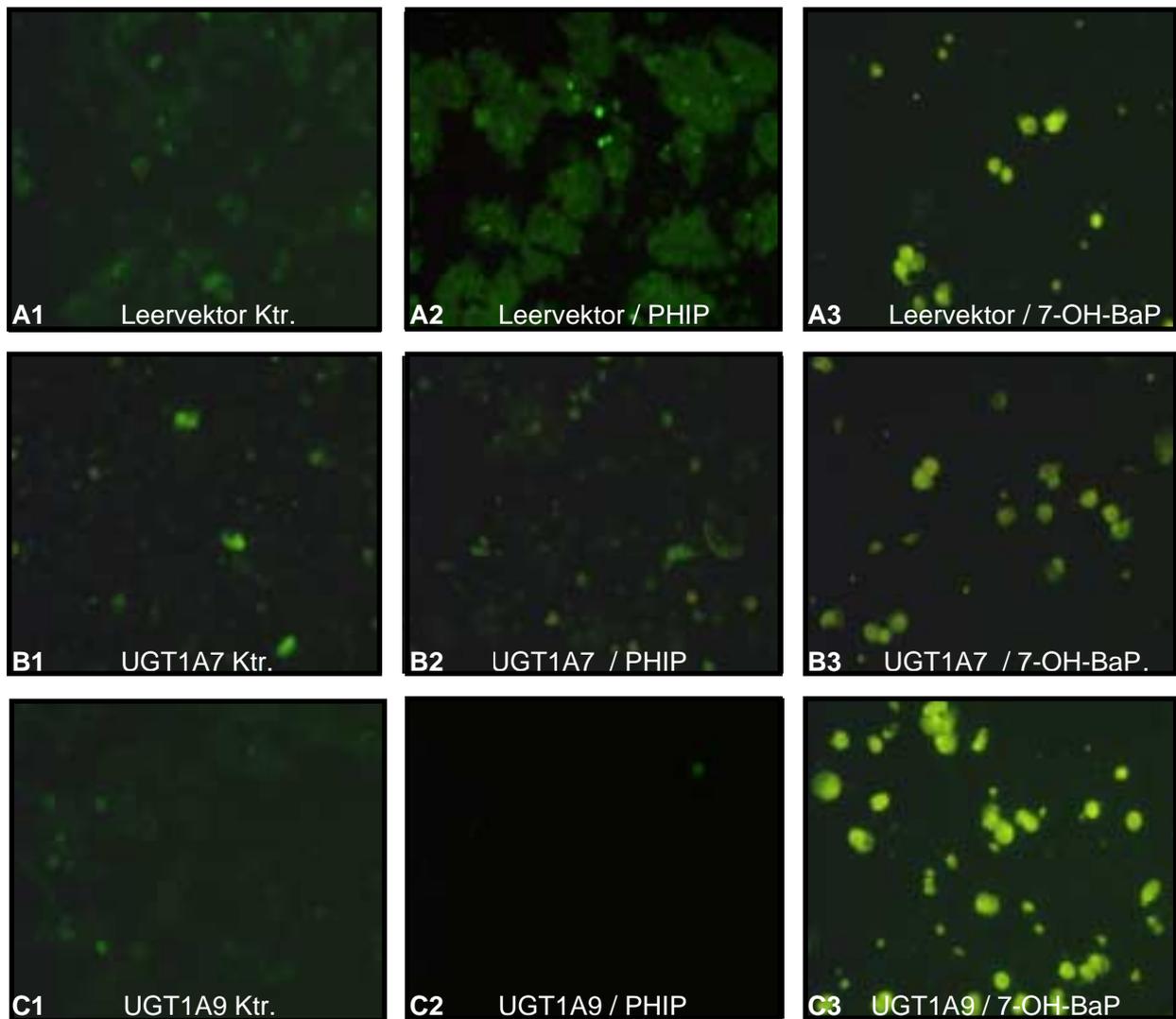


Abb. 3.16 Apoptoseinduktion in stabil transfizierten HEK-293 Zellen nach Karzinogenexposition

1,5 x 10⁵ Zellen wurden mit 100 µM der Substrate PhIP und 7-Hydroxybenzo(α)pyren (7-OH-BaP) 24 h behandelt. Die Apoptose der Zellen wurde durch Inkubation mit einem Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelten Marker nachgewiesen, der an aktivierte Caspasen bindet. PhIP-behandelte Zellen zeigten keine Zunahme der Apoptose gegenüber nicht behandelten Zellen während 7-OH-BaP zu einer starken Zunahme der Apoptose führte. A: HEK-293 Zellen, die mit dem Leervektor pcDNA transfiziert wurden, B: UGT1A7-exprimierende HEK-293 Zellen, C: UGT1A9-exprimierende HEK-293 Zellen, 1: unbehandelte Zellen, 2: PhIP-behandelte Zellen, 3: 7-OH-BaP-behandelte Zellen.

Um das Apoptoseverhalten besser quantifizieren zu können, wurden mit dem gleichen FITC-Marker durchflusszytometrische Messungen durchgeführt. Zusätzlich wurden die nekrotischen Zellen mit Propidiumiodid gefärbt. Dazu wurden 3 x 10⁵ Zellen in 6-well Schalen ausgesät und nach 48 h Wachstum mit je 100 µM Substrat für weitere 24 h behandelt. Gefärbt wurden die Zellen anschließend für 30 min bei 37°C mit 10 µM FITC-Caspase-Marker und mit 4 µg/ml Propidiumiodid. Nach 2 Waschschritten wurden die Zellen in 400 µl PBS/2%FCS aufgenommen. Im Durchflusszytometer wurden in jeder Messung

10000 Zellen gezählt und je nach Intensität der beiden gemessenen Fluoreszenzkanäle in Fluoreszenz-negative Ereignisse (gesunde Zellen), Propidiumiodid-positive Ereignisse (nekrotische Zellen) und FITC-positive Ereignisse (apoptotische Zellen) aufgeteilt. Abbildung 3.17 zeigt die prozentuale Aufteilung der 10000 gezählten Zellen.

Es wird deutlich, dass nach PhIP-Behandlung das Apoptoseverhalten der Zellen geringfügig abnimmt, während es bei Hydroxybenzo(α)pyren-behandelten Zellen stark zunimmt. Dieses Ergebnis bestätigt die mikroskopischen Daten. Ein Einfluss der UGT-Expression auf das Apoptoseverhalten ergibt sich nicht.

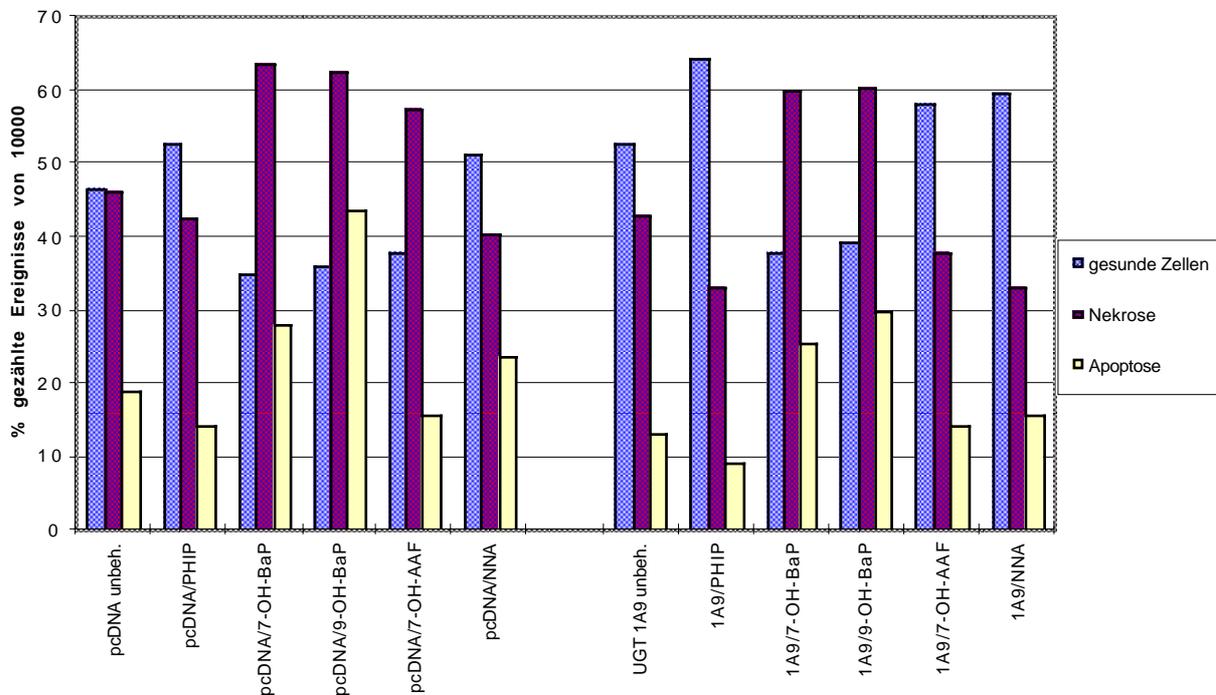


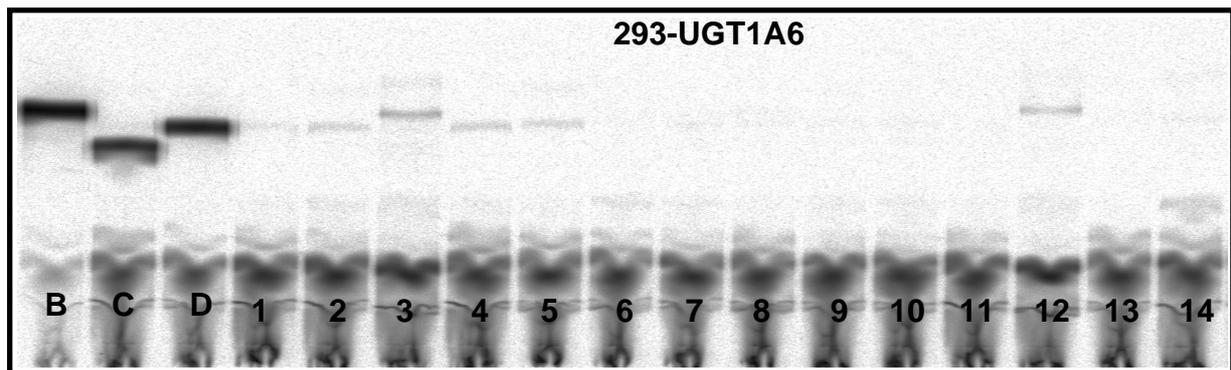
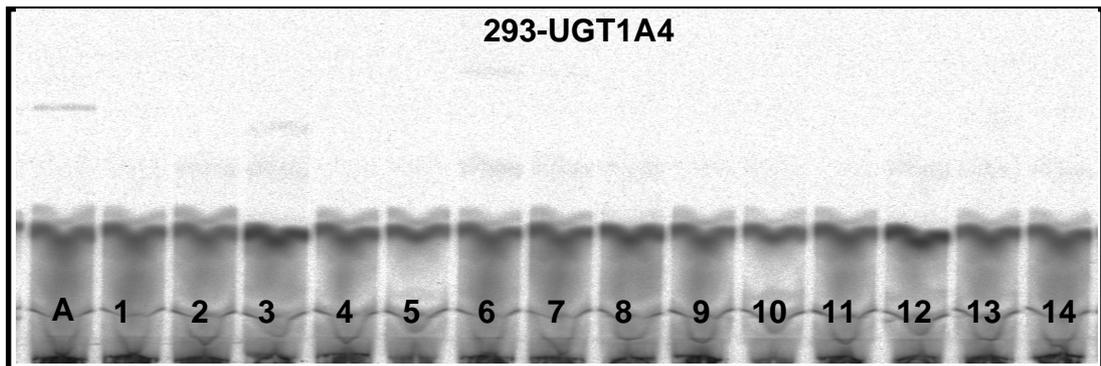
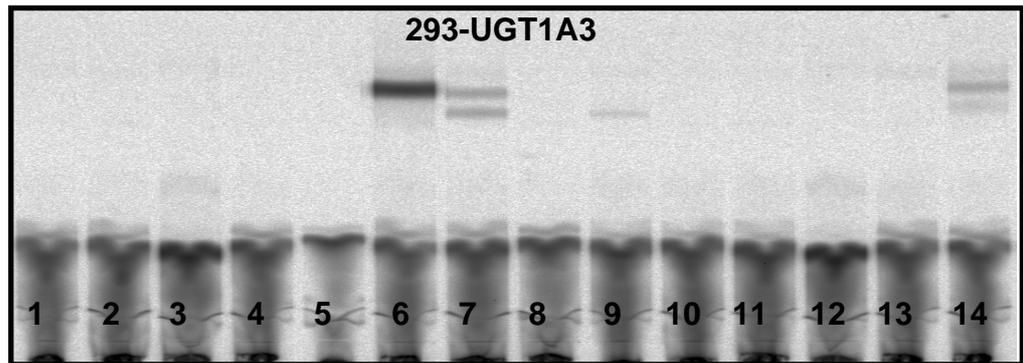
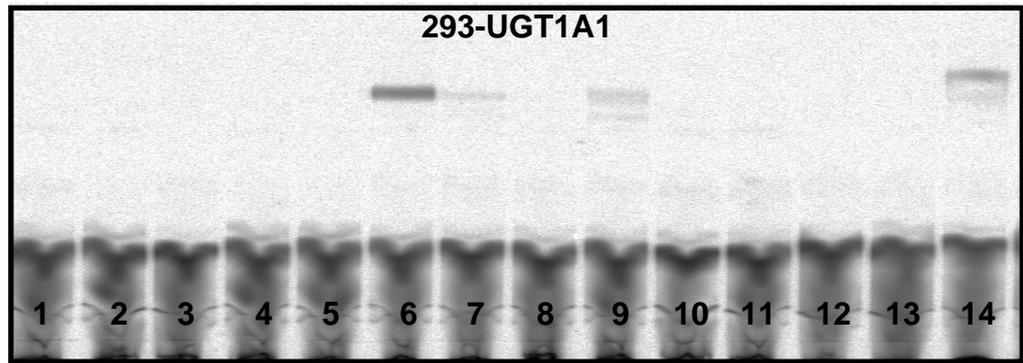
Abb. 3.17: Darstellung des Anteils FITC- und Propidiumiodid-gefärbter HEK-293 Zellen im Durchflusszytometer

3×10^5 Zellen wurden mit 100 μ M Substrat behandelt und mit FITC-Caspase-Marker sowie Propidiumiodid gefärbt. Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil von 10000 Zellen. Die linken 6 Säulengruppen sind Zellen, die mit dem Leervektor pcDNA transfiziert wurden und kein UGT exprimieren, die rechten sind UGT1A9-exprimierende Zellen. Beide Gruppen wurden jeweils mit den Substraten PhIP, 7-OH-BaP, 9-OH-BaP, 7-OH-AAF und NNA behandelt.

3.4 KONTROLLE DER KATALYTISCHEN AKTIVITÄT NACH 50 PASSAGEN

Stabil transfizierte Zellen verändern im Laufe der Passagen ihr Genom. Dadurch kann es zum Verlust der transfizierten cDNA und damit auch zum Verlust der Expression des studierten Genprodukts kommen. Um dieser Möglichkeit entgegenzuwirken, wurde der Selektionsdruck auf die Zellen während ihrer Kultivierung mit dem Antibiotikum G418 ständig aufrecht erhalten. Zur Dokumentation der Stabilität der UGT1A-Expression nach 50 Passagen sollte die Aktivität der exprimierten Genprodukte überprüft werden.

Dazu wurden aus den transfizierten Zellen Mikrosomen hergestellt. Je 20 µg wurden anschließend für einen Aktivitätsassay verwendet. Abbildung 3.18 zeigt individuelle katalytische Profile für die einzelnen UGT-Isoformen. Die transfizierten Zellen exprimieren auch nach Passage 50 noch individuelle aktive UGT-Isoformen. Tabelle 3.1 fasst die spezifischen Aktivitäten der einzelnen UGT-Proteine für die verwendeten Substrate in pmol/mg/min zusammen.



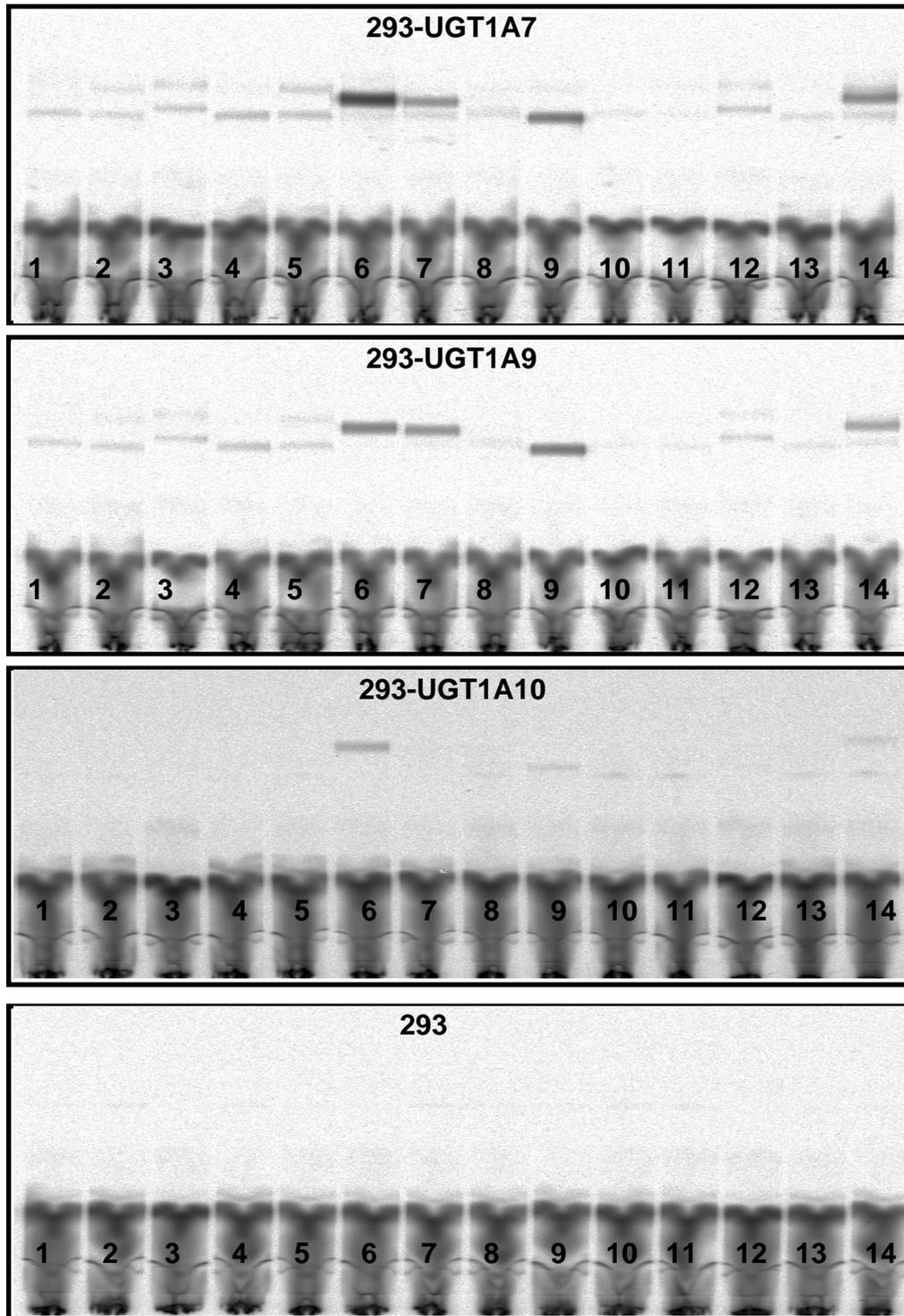


Abb.3.18: UGT-Aktivitätsprofil der stabil transfizierten HEK-293 Zellen

Je 50 µg Zellextrakt der stabil transfizierten HEK-293 Zellen wurde zusammen mit ^{14}C markierter UDP-Glukuronsäure und verschiedenen Substraten 1 h bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht. Es wurden folgende Substrate verwendet:

1: Benzanthrazen, 2: 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolin (IQ) 3: 2-Amino-1-methyl-6-phenyl-1-H-imidazo [4,5-b] pyridin (PhIP) 4: 3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido-[4,3-b]indolacetat (TrpP1) 5: 2-Acetylaminofluoren (2-AAF) 6: 7-Hydroxybenzo(α)pyren (7-OH-BaP) 7: 8-Hydroxybenzo(α)pyren (8-OH-BaP) 8: Benz(α)pyren-trans-7,8-dihydrodiol (7-8-dOH-BaP) 9: 7-Hydroxy-2-acetylaminofluoren (7-OH-AAF) 10: 4-(N-Methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) 11: 4-(N-Methyl-N-nitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanal (NNA) 12: 2-Amino-3,8-dimethyl-imidazo [4,5-f] quinoxalin (MeIQX) 13: 2-Nitro-1-methyl-6-phenyl-imidazo[4,5-b]pyridin (N-Hydroxy-PhIP) 14: 9-Hydroxybenzo(α)pyren (9-OH-BaP) A: Amitryptilin B: 1-Naphtol C: 4-Methylumbelliferon D: Para-Nitrophenol

		pcDNA	UGT1A1	UGT1A3	UGT1A4	UGT1A6	UGT1A7	UGT1A9	UGT1A10
Amitryptilin	A				6				
1-Naphtol	B					636			
4-Umbelliferon	C					567			
Para-Nitrophenol	D					505			
Benzanthrazen	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	20	13	10	n.d.
IQ	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14	13	13	n.d.
PhIP	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	33	20	15	n.d.
TrpP1	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14	21	17	n.d.
2-AAF	5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11	35	22	n.d.
7-OH-BaP	6	n.d.	183	358	n.d.	n.d.	351	179	17
8-OH-BaP	7	n.d.	13	145	n.d.	5	108	97	n.d.
7-8-d-OH-BaP	8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5	12	8	n.d.
7-OH-AAF	9	n.d.	34	n.d.	n.d.	n.d.	229	228	n.d.
NNK	10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6	n.d.	n.d.
NNA	11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MeIQX	12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	19	19	11	n.d.
N-OH-PhIP	13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9	10	n.d.
9-OH-BaP	14	n.d.	47	124	n.d.	n.d.	180	62	n.d.

Tab. 3.1: Spezifische Aktivität stabil transfizierter HEK-293 Zellen in pmol/mg/min

Dargestellt sind die Abbildung 3.18 zugrunde liegenden spezifischen Aktivitäten für die einzelnen stabil transfizierten UGT bzw. den Leervektor pcDNA mit verschiedenen karzinogenen Substraten. Die spezifische Aktivität ist in pmol/mg/min angegeben, n.d.: nicht detektiert.

3.5 INDUKTION VON UGT-EXPRESSION DURCH KARZINOGEN-EXPOSITION

Abschnitt 3.1 hat gezeigt, dass HEK-293 Zellen eine geringe endogene UGT1A-mRNA-Expression aufweisen, die nicht zu einer messbaren UGT-Aktivität oder zu einer immunologisch detektierbaren Bande führt. Die selektive Induktion von UGT1A-Genen in HEK-293 Zellen durch die Behandlung mit polyaromatischen und heterozyklischen Kohlenwasserstoffen ist noch wenig untersucht.

Um auszuschließen, dass eine substratinduzierte UGT-Expression einen Einfluss auf die zu untersuchende Zytotoxizität und Zytoprotektion ausübt, sollte die UGT-mRNA-Expression von HEK-293 Zellen, die nur das pcDNA-Plasmid enthielten, nach Substratbehandlung durch PCR-Analyse nachgewiesen werden. Dazu wurden $3,5 \times 10^5$ Zellen/well in 6-well Platten ausgesät und nach

24 h Inkubation im 37°C Brutschrank mit verschiedenen Substraten in einer Konzentration von 25 μM (Ausnahme: β -Naphthol: 100 μM , TrpP1: 10 μM) für weitere 72 h inkubiert. Anschließend wurde aus den Zellen RNA isoliert, die dann mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben wurde. Die cDNA diente als Vorlage zur Amplifikation spezifischer UGT-Sequenzen mit Hilfe entsprechender Primer (siehe Material und Methoden). Als Kontrollen dienten Zellen, die mit der jeweiligen UGT-Isoform stabil transfiziert waren, sowie Methanol-behandelte Zellen, da die meisten Substrate darin gelöst waren. Mit den verwendeten Substraten wurde keine Induktion der UGT1A-Isoformen bewirkt. Abbildung 3.19 zeigt exemplarisch den Gelauftrag der PCR von UGT1A6 und UGT1A7.

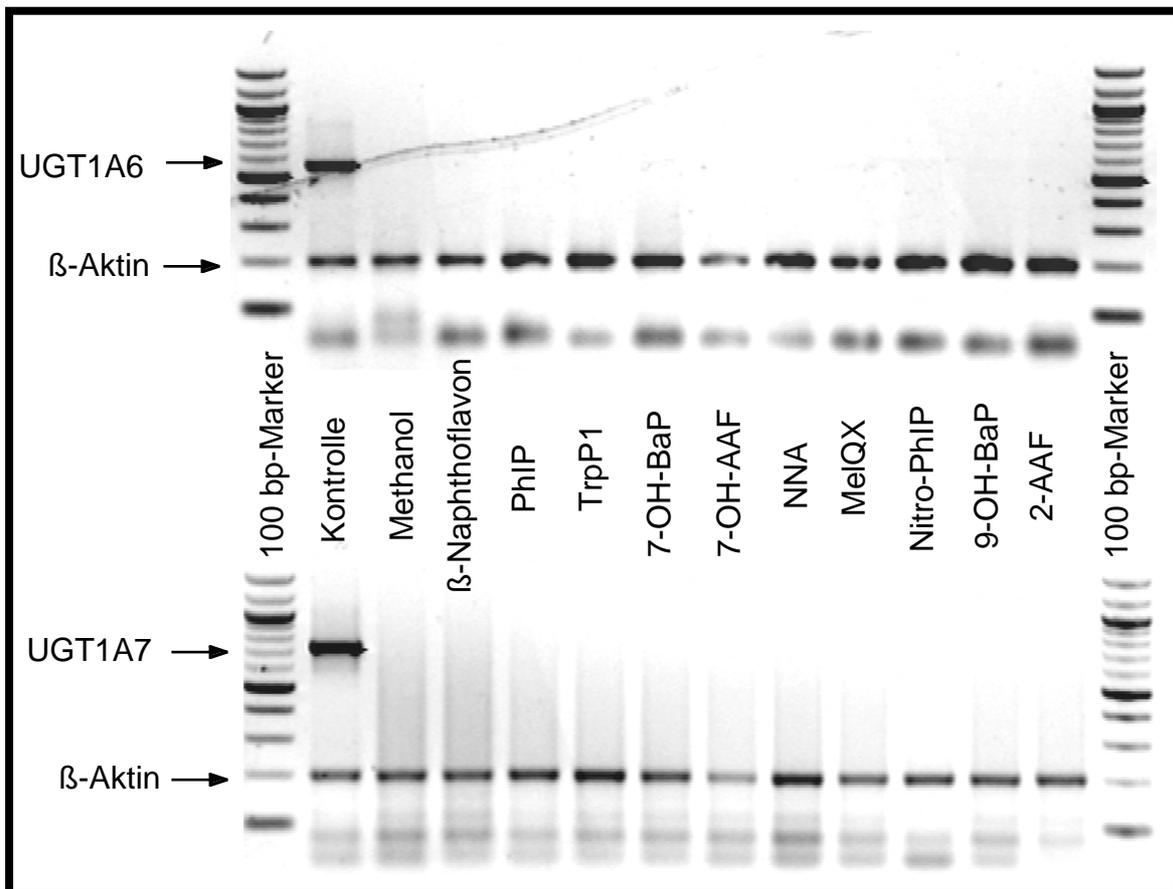


Abb. 3.19: Induktion der UGT-Expression von HEK-293 Zellen durch verschiedene Substrate

HEK-293 Zellen wurden mit 25 μM (bzw. 10 μM für TrpP1 und 100 μM für β -Naphthoflavon) der oben angegebenen Substrate 72 h behandelt. Die RNA der Zellen wurde in cDNA umgeschrieben, die wiederum als Vorlage zur Amplifizierung von Genabschnitten verschiedener UGT1A-Isoformen diente. Exemplarisch dargestellt ist der Gelauftrag für UGT1A6 und UGT1A7. Als Positivkontrolle diente cDNA der UGT1A6- bzw. UGT1A7-stabil transfizierten Zellen. Als Negativkontrolle wurde cDNA von Methanol-behandelten Zellen verwendet.

4. DISKUSSION

Die Familie der UDP-Glukuronosyltransferasen (UGT) spielt bei der Detoxifikation endogener und exogener Substanzen eine zentrale Rolle. Störungen ihrer Genexpression können wie im Fall von *UGT1A1* die Akkumulation von toxischen Substanzen im Körper, in diesem Fall Bilirubin, bewirken. Es liegt daher nahe, dass auch eine verminderte Expression anderer Mitglieder dieser Genfamilie zu pathophysiologisch relevanten Schädigungen führt. Wird beispielsweise der Metabolismus von mutagenen und karzinogenen Substanzen modifiziert und deren Inaktivierung und Ausscheidung erschwert, so ist eine schnellere Tumorinitiation im Körper möglich (Kim und Wells 1996; Tukey und Strassburg, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit ist ein Zellkulturmodell entwickelt worden, mit dem die Wirkung einzelner Isoformen auf Karzinogen-behandelte Zellen getestet werden kann. Mit Hilfe dieses Modells konnte eine Zytoprotektion durch mehrere UGT1A-Isoenzyme gegenüber PhIP-behandelten Zellen nachgewiesen werden, sowie eine Protektion einzelner Isoformen gegenüber 7-Hydroxy-Acetylaminofluoren (7-OH-AAF) und 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxalin (MelQX).

4.1 SIND STABILE ZELLINIEN EIN GEEIGNETES MODELL FÜR ZYTOPROTEKTIONSEXPERIMENTE?

Die Vielfalt der UGT-Isoformen ist im Laufe der Evolution vermutlich durch Genduplikation und Retroposition entstanden, deren Effekt den Organismen möglicherweise einen selektiven metabolischen Vorteil brachte (Brierley und Burchell, 1993). Da die biologische Evolution mit der chemischen Entwicklung nicht gekoppelt ist, steht den Enzymen eine Fülle potentieller Substrate gegenüber. Die UGT katalysieren die Glukuronidierung hunderter exogener Substrate und eine Vielzahl endogener Substanzen wie Bilirubin, Gallensäuren, Steroidhormone und Schilddrüsenhormone (Owens und Ritter, 1995).

Die Glukuronidierung unterliegt beim Menschen einer interindividuellen Variabilität und ist organspezifisch reguliert (Strassburg *et al.*, 1997b, 1998a, 1998b, 2000). Tephly und Burchell postulierten 1990, dass ein 10-facher Unterschied in der Metabolisierung von Chemikalien nicht ungewöhnlich ist, und möglicherweise vom Alter, vom Geschlecht, von der Chemikalienexposition und vom genetischen Hintergrund abhängt. Sowohl im Magen als auch im Dünndarm haben Strassburg *et al.*, 1998a und 2000 interindividuelle Unterschiede in der Expression einzelner *UGT*-Isoformen nachgewiesen, während die Expression in der Leber weitgehend konstant war. Hu und Wells hatten 1993 in Lymphozyten verschiedener Individuen eine 200-fach unterschiedliche *UGT*-Aktivität gegenüber Benzo(α)pyren-Metaboliten nachgewiesen. Inzwischen sind Polymorphismen für die Isoformen *UGT1A1*, *UGT1A6*, *UGT2B4*, *UGT2B7* und *UGT2B15* gefunden worden (Mackenzie *et al.*, 2000, Tukey und Strassburg, 2000, Strassburg und Manns, 2000).

Um Aktivitätsschwankungen sowie die überlappenden Substratspezifitäten der *UGT*-Proteine bei funktionellen Studien zu minimieren, musste die Komplexität des Systems zunächst auf definierte Bedingungen reduziert werden. Zur funktionellen Analyse einzelner *UGT1A*-Isoformen wurde daher eine humane embryonale Zelllinie (HEK-293) verwendet, die keine endogene *UGT*-Aktivität zeigte, die sich effizient transfizieren ließ, die mit einer Verdoppelungsrate von 20-24 h ein relativ schnelles Wachstum aufwies, und für die bereits publizierte Daten einer erfolgreichen stabilen Transfektion von *UGT*-cDNAs vorlagen (Cheng *et al.*, 1999). Individuelle cDNAs der *UGT1A*-Genfamilie wurden stabil in die Zellen transfiziert, um eine konstante *UGT*-Expression zu gewährleisten. Abschnitt 4.4 zeigt, dass die *UGT*-Aktivität in den entwickelten stabilen Zelllinien bis Passage 50 erhalten blieb.

Für die verschiedenen *UGT*-Isoformen wurden jeweils mehrere Klone isoliert und getestet. Dabei zeigte sich, dass nicht alle identisch selektionierten Klone über eine gleich hohe *UGT*-Expression und -Aktivität verfügten. Für die Zytoprotektionsexperimente wurden die jeweils aktivsten Zellklone ausgewählt, und die anschließenden Experimente wurden ausschließlich mit diesen Klonen durchgeführt.

Zelllinien können als *in-vitro*-System naturgemäß nur einen kleinen Ausschnitt eines komplexen Systems widerspiegeln. Um einen Einblick in komplexere Strukturen zu gewinnen, ist es notwendig, die Ergebnisse aus den Zellkulturstudien mit den Daten aus *in-vivo*-Experimenten zu vergleichen und zu ergänzen. Dies ist jedoch für die humanen UGT ein nur schwer realisierbarer Ansatz. Mit der Herstellung stabil transfizierter HEK-293 Zellen wurde eine Grundlage für gezielte Untersuchungen zur Substratspezifität, zur Zytotoxizität und zur Induktion einzelner UGT-Isoformen gelegt.

4.2 WELCHE AUSSAGEN LASSEN DIE VERWENDETEN ASSAYS ZU?

Die stabilen UGT-exprimierenden Zelllinien können Aufschluss geben über die Zytotoxizität individueller UGT1A-Proteine in Karzinogen-behandelten Zellen. Bei der ersten Phase der chemischen Karzinogenese, der Initiation, kommt es nach kurzer Einwirkung chemischer Substanzen immer dann zur irreversiblen Schädigung des Gewebes, wenn die zelleigenen Reparaturmechanismen den Schaden nicht mehr beheben können. Durch karzinogene Substanzen kann es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies kommen, die zur Adduktbildung an Proteine, Lipide und DNA führen können. Dadurch kann es zum Verlust der Membranintegrität kommen oder zu Störungen in der Regulation des Zellzyklus, die eine Weitergabe der genetischen Veränderung an die Tochterzellen ermöglichen können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Schädigung der Plasmamembran und damit die Anzahl der sterbenden und toten Zellen durch photometrische Detektion einer Lactat-Dehydrogenase (LDH)-abhängigen Farbreaktion bestimmt. Ähnlich wie beim ⁵¹Cr-Release-Assay korreliert hier die Höhe der in den Zellkulturüberstand abgegebenen Lactat-Dehydrogenase linear mit dem Anteil lysierter Zellen. Die photometrische Detektion der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand von 96-well Platten ermöglichte einen großen Probendurchsatz. So war es möglich, die Wirkung der Exposition unterschiedlicher Substrate auf einzelne UGT1A-exprimierende Zellen zu testen. Problematisch war die relativ enge Messbreite zwischen OD-Werten von 0,5 und

4.0. Stark zytotoxische Substrate wie 7-Hydroxybenzo(α)pyren oder 1% Triton-X zur Bestimmung der maximalen LDH-Konzentration führten schnell zur Überschreitung der Detektionsgrenze des Photometers. Vor Durchführung der Protektionsexperimente wurde durch Vorversuche die optimale Zellzahl für die späteren Untersuchungen ermittelt. Messwertschwankungen wurden durch unabhängige Messungen unter gleichen Bedingungen sowie jeweils 4- bzw. 6-fach-Bestimmungen normalisiert. Für die Protektionsexperimente wurden sowohl Muttersubstanzen wie 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP) eingesetzt, die in der Zelle im Phase I-Stoffwechsel zum Beispiel durch Cytochrom P4501A1 oxidiert werden als auch ihre oxidativen Metaboliten. Der LDH-Assay dokumentierte deutliche Unterschiede in der Zytotoxizität der Substrate und zeigte zum Beispiel für PhIP mehrere, für 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxalin (MeIQX) und 7-Hydroxyacetyl-aminofluoren (7-OH-AAF) je eine zytoprotektive UGT1A-Isoform. Überraschend war das Ergebnis für die Benzo(α)pyrenmetaboliten. Hier zeigten die UGT-transfizierten Zellen eine Zunahme der Zytotoxizität.

Grove *et al.*, 2000 hatten festgestellt, dass die Zahl der toten Zellen bei hohen Substratkonzentrationen über 5 μ M stark zunimmt, möglicherweise weil die Zellschädigung zu groß wird für Reparaturmechanismen. Bei niedrigeren Substratkonzentrationen hatten die Zellen die Möglichkeit, Schäden auszugleichen, dabei wurde allerdings eine Hemmung des Zellwachstums beobachtet. In dieser Arbeit wurde aufgrund der getesteten Toxizität der Benzo(α)pyrene in Vorexperimenten eine Substratkonzentration von 100 μ M eingesetzt. Möglicherweise reicht die Glukuronidierungskapazität der Zellen nicht aus, um hier eine zytoprotektive Wirkung auszuüben. Denkbar ist auch eine Beeinflussung der Phase I-Stoffwechsel-Oxydantien durch die UGT-Überexpression in den Zellen (Lin und Lu, 2001). Dies könnte zu einer weiteren Hydroxylierung der Benzo(α)pyrene vor der Glukuronidierung und damit zu einer Zunahme ihrer Toxizität führen.

Im Aktivitätsassay wurden gerade die Benzo(α)pyrene von den meisten UGT-Isoformen glukuronidiert. Umgekehrt ist für PhIP eine Protektion im LDH-Assay nachweisbar, während dieses Substrat im Aktivitätsassay nur sehr schwache Banden bei UGT1A6, UGT1A7 und UGT1A9 zeigt.

Hier wird deutlich, dass die Glukuronidierungsaktivität der UGT1A-Enzyme in verschiedenen Assays variiert und offensichtlich durch Faktoren beeinflusst wird, die im Detail nicht geklärt sind. Sanchezpozzi *et al.*, 1995, konnten zeigen, dass gereinigte und exprimierte UGT-Isoformen unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen. In den Zelllinien ist die Wechselwirkung des kleinen zytosolischen Anteils der UGT mit anderen Faktoren des Zytoplasmas denkbar, die in den Zellextrakten nicht mehr vorhanden oder aktiv sind.

Ein zusätzlicher Erklärungsansatz ist die latente Enzymfunktion in humanen Lebermikrosomen. Durch die schlechte Membranpermeabilität wird der Zugang von Donorsubstanzen zum aktiven Zentrum des Enzyms behindert und dadurch dessen Aktivität verringert. Durch Aufschluss der Zellextrakte mittels wiederholter Einfrier-Auftau Zyklen, durch Detergentien oder durch Ultraschall-Exposition der Zellen kommt es zur Porenbildung in der Membran und dadurch zu erhöhter Aktivität, da die UDGPA schneller in die Vesikel und damit zum aktiven Zentrum des Enzyms gelangen kann (Jansen *et al.*, 1992). Diese Erkenntnis mag erklären, dass UGT1A6 für kein Substrat eine Protektion zeigt, während es im Aktivitätsassay einen Teil der verwendeten Substrate glukuronidierte.

Im Proliferationsassay wurde der Einbau von BrdU in DNA photometrisch bestimmt. Hier zeigte sich für die Substrate N-Hydroxy-PhIP, 7-Hydroxybenzo(α)pyren und 9-Hydroxybenzo(α)pyren, die schon im LDH-Assay eine hohe Zytotoxizität aufwiesen, eine entsprechende Hemmung der Proliferation. Dies kann die Folge einer reduzierten Zellzahl sein, was bei der Exposition mit zytotoxischen Substraten nahe liegt. Andererseits führen p53-abhängige Reparaturmechanismen zum Proliferationsarrest der Zelle in der G1-Phase des Zellzyklus.

Das p53 Protein stimuliert auch die Apoptose geschädigter Zellen und kontrolliert dadurch einen zentralen Mechanismus zur Eliminierung neoplastisch initiiertes Zellen (Renehan *et al.*, 2001). Untersuchungen zum Apoptoseverhalten substratbehandelter Zellen ergaben für Benzo(α)pyren eine deutliche Zunahme der Apoptose gegenüber unbehandelten Zellen, während PhIP die Apoptoseinduktion der Zellen nicht erhöhte. Um zusätzlich zum direkten mikroskopischen Eindruck der Apoptoseinduktion bei Karzinogenexposition eine quantitative Analyse durchzuführen, wurden die Zellen mit einem FITC-CaspACE-Marker und Propidiumiodid doppelt gefärbt und durchflusszytometrisch ausgewertet. Dabei bestätigten sich die mikroskopischen Auswertungen. Der Apoptoseanteil PhIP-behandelter Zellen war sogar etwas geringer als bei unbehandelten Zellen, während er bei 7-Hydroxybenzo(α)pyren-behandelten Zellen deutlich höher lag. Für beide Substrate wurde das Apoptoseverhalten durch UGT1A9-Expression nicht beeinflusst. Das heißt, die UGT-Expression in den PhIP-behandelten HEK-293 Zellen beeinflusst nicht die Apoptose, wohl aber die Zytotoxizität. Während Benzo(α)pyren-behandelte Zellen eine hohe Apoptoserate zeigen, leben die PhIP-exponierten Zellen mit der Schädigung weiter und können Mutationen an die Tochterzellen weitergeben, wo sie als irreversible Schädigung erhalten bleiben und das Karzinogeneserisiko erhöhen. Da die Expression einzelner UGT1A-Isoformen die PhIP-vermittelte Zytotoxizität signifikant verringern konnte, kann damit eine antikarzinogenetische Wirkung der UGT gegenüber PhIP, einem der wichtigsten menschlichen Karzinogene (Nagao, 1999) postuliert werden. Die hier verwendeten Assays zeigen die ersten direkten Daten einer UGT Zytoprotektion. Direkte Vergleichsstudien liegen zur Zeit nicht vor, Protektionsstudien mit anderen Zellsystemen und Methoden bestätigen jedoch den Trend dieser Befunde.

Differentielle zytoprotektive Effekte zeigten Grove *et al.*, 2000, durch Zellzahlzählungen bei UGT1A7-transfizierten lymphoblastoiden Zellen. Dabei wurden für die Behandlung mit den Benzo(α)pyren-Metaboliten 3-Hydroxybenzo(α)pyren und Benzo(α)pyren-7,8-diol keine protektiven Effekte auf das Proliferationsverhalten der behandelten Zellen nachgewiesen, während die

Behandlung mit Benzo(α)pyren-6,12-quinon bei den UGT1A7-transfizierten Zellen zu einer geringeren Proliferationsinhibition führte.

Andere Arbeitsgruppen untersuchten die protektive Funktion der UGT anhand von Mikronukleusbildung bei substratbehandelten UGT-defizienten Ratten gegenüber UGT-positiven Ratten. Vieneau *et al.*, 1995 stellten so fest, dass nach Benzo(α)pyren-Behandlung die Mikronukleusbildung bei Fibroblasten UGT-defizienter Ratten doppelt so hoch war wie bei der Kontrollgruppe. Mit einem ähnlichen Modell stellten Kim und Wells 1996 eine erhöhte Mikronukleusbildung bei UGT-defizienten Ratten nach Behandlung mit 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) fest.

Orzechowski *et al.*, 1994, untersuchten im Amestest die Mutantenbildung des Bakterienstamms TA 1535 nach Inkubation mit N-Hydroxy-2-naphthylamin und einem Mix aus S9-Präparationen humaner Leber bzw. Leber von 3-Methylcholanthren-behandelten Ratten zusammen mit rekombinantem UGT1A6 aus V79 Zellkulturen. Eine signifikante Abnahme der Mutantenzahl wurde erst nach Zugabe von 3 mM UDP-Glukose nachgewiesen.

Mit dem gleichen Test zeigten Wakabayashi *et al.*, 1992 und Davis *et al.*, 1993 die mutagene Wirkung von PhIP, IQ und MelQX, ohne jedoch eine protektive Funktion der UGT zu untersuchen. Diese wurde jedoch kürzlich im Salmonella - Ames-Modell von Yueh *et al.*, 2001 untersucht. Für UGT1A9 konnte dabei eine protektive Wirkung gegenüber N-Hydroxy-2-AAF-exponierten *Salmonella typhimurium* Zellen gezeigt werden. Diese Ergebnisse bestätigen damit in einem anderen Modell die protektive Wirkung einzelner UGT1A-Proteine.

Protektionsstudien sind bislang auf wenige Isoformen und Substrate beschränkt geblieben. Das hier etablierte Zellkulturmodell bietet die Möglichkeit, die gewonnenen Daten auf andere Substrate auszudehnen, und das Glukuronidierungsverhalten einzelner Isoformen wie beispielsweise UGT1A6 näher zu charakterisieren. Alle verwendeten Assays geben naturgemäß durch die gewählten Bedingungen nur einen kleinen Ausschnitt aus der protektiven Funktion der UGT wieder. Mit dem hier etablierten System konnte erstmalig direkt in humanen Zellen eine isoform- und substratspezifische Zytoprotektion

humaner UGT1A-Proteine gezeigt werden, die für die epidemiologisch entscheidenden Karzinogene von großer Bedeutung ist.

4.3 WIE IST DIE ÜBERTRAGBARKEIT DER EXPERIMENTE AUF DIE PROTEKTION IN VIVO?

Das in dieser Arbeit etablierte Zellkulturmodell konnte eine konzentrationsabhängige Schädigung der Zellen durch die verwendeten Karzinogene aufzeigen. Diese Substanzen sind Bestandteile unserer Umwelt. Der Kontakt mit Benzo(α)pyrenen entsteht durch Inhalation von Rauch und Abgasen, von Kohle, Holz, Tabak, Dieselöl (Grove *et al.*, 2000). Durch die Einnahme gegrillter oder geräucherter Lebensmittel gelangen Benzo(α)pyrene in unseren Gastrointestinaltrakt, wo sie dem Phase I-Stoffwechsel unterliegen und bis zu 20 verschiedene primäre Metaboliten bilden können (Grove *et al.*, 2000). In gekochtem und gebratenem Fleisch sind heterozyklische Amine enthalten. Den größten Anteil daran bildet PhIP mit 83 - 93%, es entsteht durch die Kondensation von Kreatinin in Fleisch und Fisch durch Erhitzen mit hohen Temperaturen (Turteltaub *et al.*, 1990). Weiter sind noch MelQX, 4,8-DiMelQX und IQ, nachgewiesen worden. (Felton *et al.*, 1992). Für PhIP wurde eine DNA-Addukt-Bildung beispielsweise in der Maus nachgewiesen (Felton *et al.*, 1992).

Die Mukosa des Gastrointestinaltrakts ist die erste Kontaktstelle der Karzinogene und Mutagene mit dem menschlichen Organismus. Die Effektivität der Glukuronidierung der extrahepatischen Mukosa kann daher ein wichtiger Faktor zur Reduzierung nahrungsmittelbedingter intestinaler Tumoren sein.

Im Gegensatz zur Leber ist die Expression in der UGT1A-Isoenzyme in der gastrointestinalen Mukosa interindividuell verschieden (Strassburg *et al.*, 1998a, Strassburg *et al.*, 2000). Die Aktivität der meisten Enzyme des Phase II-Stoffwechsels nimmt im Dünndarm von proximal nach distal ab. Ein besonders starker Aktivitätsabfall ist im Kolon beobachtet worden (Peters *et al.*, 1991, Strassburg *et al.*, 1999a, Tukey und Strassburg, 2001). Dieses Ergebnis korreliert mit einer hohen Karzinogeneserate im Kolon (Jin *et al.*, 1993a).

Die Expression einzelner UGT-Isoformen ist nicht nur interindividuell verschieden, sie verändert sich auch im Tumorgewebe. So wurden die Isoformen UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4 und UGT1A9 im hepatozellulären Karzinom (HCC) differentiell herabreguliert. Im cholangiozellulären Karzinom (CCC) war die Expression der Isoformen UGT1A4 und UGT1A10 geringer als im Normalgewebe der gleichen Person (Strassburg *et al.*, 1997a). Beim Adenokarzinom des Magens wurde eine Herabregulation für UGT1A1, UGT1A3 und UGT1A6 nachgewiesen, während UGT1A7 leicht hochreguliert wurde (Strassburg *et al.*, 1998a). Im Plattenzellkarzinom des Ösophagus wurde eine verminderte Expression von UGT1A7 und UGT1A10 nachgewiesen. Dabei konnte außerdem gezeigt werden, dass 7-Hydroxybenzo(α)pyren im Tumorgewebe 5-fach weniger glukuronidiert wurde. Die stärkste Glukuronidierungsaktivität gegenüber 7-Hydroxybenzo(α)pyren und gegenüber N-Hydroxy-PhIP zeigte die Isoform UGT1A9 (Strassburg *et al.*, 1999b).

Für PhIP konnte im vorgestellten Zellkulturmodell eine Protektion durch die Isoformen UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A7, UGT1A9 und UGT1A10 gezeigt werden. Eine verminderte interindividuelle Expression einzelner UGT1A-Transkripte bzw. ihre differentielle Herabregulation repräsentieren daher sehr wahrscheinlich einen karzinogenetischen Risikofaktor.

Mit UGT-Defizienz assoziierte Krankheitsbilder wie die Hyperbilirubinämie im Crigler-Najjar- und im Gilbert-Syndrom sind bislang nur für UGT1A1 nachgewiesen worden. Bei *UGT1A6* wurden zwei Missense-Mutationen entdeckt, die bei 30% der Bevölkerung vorkommen. Bislang wurde für die damit verbundene Reduktion der katalytischen Aktivität noch keine klinische Relevanz festgestellt (Mackenzie *et al.*, 2000). Bei exogenen Substanzen ist ein kausaler Zusammenhang *in vivo* schwerer nachzuweisen, da die Substanzen selten isoliert eingenommen werden und zum Teil von mehreren Isoformen glukuronidiert werden können.

Sowohl die unterschiedliche interindividuelle und gewebsspezifische UGT-Aktivität als auch die veränderte UGT-Expression in verschiedenen Tumoren deuten darauf hin, dass UGT1A Risikogene der Krebsentstehung darstellen, die über bisher nur inkomplett geklärte Regulationsmechanismen ihre zytoprotektive Wirkung in den Expositionsgeweben des Menschen entfalten.

4.4. WIE WIRD DIE UGT-EXPRESSION REGULIERT?

Die Induktion der UGT-Expression durch die klassischen Cytochrom P450-Enzyminduktoren 3-Methylcholanthren und Phenobarbital bei der Ratte ist durch zahlreiche Studien belegt (Inscoc und Axelrod, 1960; Bock *et al.*, 1973, 1979, 1988, 1990). Hinweise auf eine durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) induzierte UGT-Expression beim Menschen ergaben Befunde von Rauchern, die eine erhöhte Glukuronidierung von Paracetamol und Propanolol zeigten (Mucklow *et al.*, 1980, Walle *et al.*, 1987, Bock *et al.*, 1987, Bock *et al.*, 1994). Untersuchungen humaner Zelllinien ergaben, dass mindestens zwei PAH-induzierbare UGT1A-Isoformen existieren. In der humanen Kolon-Adenokarzinomzelllinie Caco-2 wiesen Bock *et al.*, 1998 eine TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorobenzo-p-dioxin)-abhängige Induktion von UGT1A6-mRNA um den Faktor 4 und von UGT1A9-mRNA um den Faktor 3 nach.

Eine Induktion der UGT-Expression durch β -Naphthoflavon wurde von Abid *et al.*, 1997 in verschiedenen humanen Hepatomzelllinien und in humanen Hepatozyten von vier Individuen gezeigt. Eine isoformspezifische Induktion durch β -Naphthoflavon in humanen Caco-2 Zellen wiesen Sabolovic *et al.*, 2000 für UGT1A6 und UGT1A3 nach. Chrysin (5,7-Dihydroxyflavon) führte bei humanen HepG2 Zellen zu einer Induktion von UGT1A1, während UGT1A6 nicht induziert wurde (Walle *et al.*, 2000).

Die Regulation der Genexpression durch aromatische Kohlenwasserstoffe erfolgt über ihre Bindung an den Arylhydrocarbon Receptor (AhR) im Zytoplasma. Sie gelangen durch Bildung eines Komplexes mit dem ARNT-Protein (Ah receptor nuclear translocator) in den Zellkern und binden hier an XREs (xenobiotic response elements) in der 5'-flankierenden Region einzelner Gene.

Für humanes *UGT1A6* konnten Münzel *et al.*, 1998, in Caco-2 Zellen ein TCDD-induzierbares *XRE*-Motiv identifizieren. Weitere regulatorische Elemente wie *CREB* und stromaufwärts der *XRE* ein Poly (*dC-dA*)-Motiv identifizierten sie in der Lungenkarzinomzelllinie A-549. Letzteres führt zur Z-DNA-Bildung und ist assoziiert mit der Inhibition der Gentranskription (Hamada und Kakunaga, 1982; Naylor und Clark, 1990; Miyanaga und Shimasaki, 1993).

Owens und Ritter, 1995, hatten festgestellt, dass jede *UGT1A*-Isoform in ihrer 5'-flankierenden Sequenz ein TATA-ähnliches Element aufweist und dadurch unabhängig reguliert werden kann. Für *UGT1A6* zeigte eine Primer Extension Analyse mindestens 2 TATA-Boxen (Münzel *et al.*, 1998). Möglicherweise wird die TCDD-induzierbare Expression von *UGT1A6* in Caco-2 Zellen und dessen konstitutive Expression in A 549 Zellen über verschiedene TATA-Boxen vermittelt.

Bei den oben beschriebenen Hepatom und Caco-2 Zelllinien handelt es sich um Tumorzellen, während die in der vorliegenden Arbeit verwendeten HEK-293 Zellen embryonale Nierenzellen sind. Verschiedene Untersuchungen zur ontogenetischen Entwicklung der UGT zeigen Unterschiede in der hepatischen Glukuronidierung während der Entwicklung von fetaler zu adulter Leber. Kawade und Onishi unterschieden 1981 drei Entwicklungsphasen für die Bilirubin-Glukuronidierung. In der mittleren Fetalzeit betrug sie 0,1%, in der späten Fetal- und in der Neonatalperiode war sie 0,1 bis 1%, und in der frühen infantilen Phase betrug sie 1-100% der Aktivität adulter Individuen. Auch gegenüber anderen Substraten wie Testosteron, Androsteron, 1-Naphtol, 4-Nitrophenol und 2-Aminophenol betrug die Glukuronidierungsaktivität in fetaler Leber weniger als 14% der Aktivität in adulter Leber (Leakey *et al.*, 1987). Die meisten UGT-Aktivitäten entwickeln sich in den ersten 10 bis 20 Wochen postnatal (Burchell *et al.*, 1989). Eine Analyse der Leber-UGT-Transkripte ergab für die 20. Schwangerschaftswoche keine UGT-Transkripte, während bei Geweben von 6 Monate alten Kleinkindern alle UGT-Transkripte der adulten Leber nachgewiesen wurden (Strassburg *et al.*, zur Publikation eingereicht).

Die in dieser Arbeit verwendeten embryonalen HEK-293 Zellen zeigten keine endogene UGT-Aktivität. Um zu prüfen, ob die in den Protektionsexperimenten dieser Arbeit verwendeten Substrate eine Induktion der UGT1A-Expression bewirken können, wurden die Zellen zunächst mit 25 μM der Karzinogene über 72 h inkubiert.

Die UGT1A-Induktion wurde anhand der mRNA-Expression für die einzelnen Isoformen mittels RT-PCR überprüft. Dabei wurde durch kein Substrat eine Induktion einzelner Isoformen bewirkt. In einem weiteren Ansatz wurden die mit 100 μM behandelten Zellen eines LDH-Assays auf eine mögliche UGT-Induktion untersucht. Auch hier zeigte sich unter den eingesetzten experimentellen Bedingungen keine UGT1A-Induktion. Als zusätzliches Substrat zur Überprüfung der UGT1A-Induktion auf mRNA-Ebene wurde β -Naphthoflavon in einer Konzentration von 100 μM verwendet, da Sabolovic *et al.*, 2000, eine Induktion in zwei von drei Caco-2 Klonen nach Behandlung der Zellen mit 100 μM über 72 h nachgewiesen hatten. Die UGT-Expression der in dieser Arbeit getesteten HEK-293 Zellen ließ sich auch durch β -Naphthoflavon nicht induzieren. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die festgestellten protektiven Effekte einzelner Isoformen nicht durch Induktion zusätzlicher UGT-Isoformen in den Zellen modifiziert wurden.

4.5 AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein humanes Zellkultursystem etabliert, mit dem es möglich war, differentielle UGT1A-Proteine zu exprimieren. Mit Hilfe dieses Systems konnte zum ersten Mal in humanen Zelllinien eine Protektion durch einzelne UGT1A-Isoformen in Karzinogen-exponierten Zellen direkt gezeigt werden. Vor dem Hintergrund der differentiellen Regulationsbefunde in Tumoren des Gastrointestinaltrakts untermauern die hier erzielten Ergebnisse die Hypothese, dass die *UGT* Krebsrisikofaktorgene sind.

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen ist die Ausweitung des Substratspektrums einzelner UGT-Proteine mit Hilfe des vorgestellten Zellkulturmodells ein zukünftiges Ziel.

Zusätzlich bieten sich jetzt Ansätze, mit diesem Modell *ex vivo* die biologische Wirkung weiterer Toxine und potentieller Therapeutika zu studieren. Dieser Ansatz würde zur Verringerung von Tierversuchen beitragen und zudem Fehlschlüsse vermeiden, die sich aus Tieranalogien ergeben. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit wäre eine Koexpression mehrerer UGT1A-Proteine oder UGT1A- und UGT2B-cDNAs, um den Einfluss der Dimerisierung oder potentieller synergistischer Effekte in der Protektion zu untersuchen. Dieses Konzept könnte bis hin zur natürlichen Koexpression der UGT in verschiedenen Geweben weiterentwickelt werden.

5. ANHANG

5.1 LITERATURVERZEICHNIS

Abid A, Sabolovic N, Magdalou J.

Expression and inducibility of UDP-glucuronosyltransferases 1-naphthol in human cultured hepatocytes and hepatocarcinoma cell lines.

Life Sci. 1997;60(22):1943-51.

Adamson RH, Thorgeirsson UP, Snyderwine EG, Thorgeirsson SS, Reeves J, Dalgard DW, Takayama S, Sugimura T.

Carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in nonhuman primates: induction of tumors in three macaques.

Jpn J Cancer Res. 1990 Jan;81(1):10-4.

Arias IM.

Chronic unconjugated hyperbilirubinemia without signs of overt hemolysis in adolescents and adults.

J Clin Invest 1962;41:2233-2245

Banhegyi G, Braun L, Marcolongo P, Csala M, Fulceri R, Mandl J, Benedetti A.
Evidence for an UDP-glucuronic acid/phenol glucuronide antiport in rat liver microsomal vesicles.

Biochem J. 1996 Apr 1;315 (Pt 1):171-6.

Bansal SK, Gessner T.

A unified method for the assay of uridine diphosphoglucuronyltransferase activities toward various aglycones using uridine diphospho[U-14C]glucuronic acid.

Anal Biochem. 1980 Dec;109(2):321-9. .

Beaulieu M, Levesque E, Hum DW, Belanger A.

Isolation and characterization of a human orphan UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B11.

Biochem Biophys Res Commun. 1998 Jul 9;248(1):44-50.

Beaulieu M, Levesque E, Tchernof A, Beatty BG, Belanger A, Hum DW.

Chromosomal localization, structure, and regulation of the UGT2B17 gene, encoding a C19 steroid metabolizing enzyme.

DNA Cell Biol. 1997 Oct;16(10):1143-54.

Belanger A, Hum DW, Beaulieu M, Levesque E, Guillemette C, Tchernof A, Belanger G, Turgeon D, Dubois S.

Characterization and regulation of UDP-glucuronosyltransferases in steroid target tissues.

J Steroid Biochem Mol Biol. 1998 Apr;65(1-6):301-10.

Birnboim HC, Doly J.

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res. 1979 Nov 24;7(6):1513-23.

Bock KW, Gschaidmeier H, Heel H, Lehmkoetter T, Munzel PA, Raschko F, Bock-Hennig B.

AH receptor-controlled transcriptional regulation and function of rat and human UDP-glucuronosyltransferase isoforms.

Adv Enzyme Regul. 1998;38:207-22.

Bock KW.

UDP-glucuronosyltransferases and their role in metabolism and disposition of carcinogens.

Adv Pharmacol. 1994, 27;376-383

Bock KW, Schrenk D, Forster A, Griese EU, Morike K, Brockmeier D, Eichelbaum M.

The influence of environmental and genetic factors on CYP2D6, CYP1A2 and UDP-glucuronosyltransferases in man using sparteine, caffeine, and paracetamol as probes.

Pharmacogenetics. 1994 Aug;4(4):209-18.

Bock KW.

Roles of UDP-glucuronosyltransferases in chemical carcinogenesis.

Crit Rev Biochem Mol Biol. 1991;26(2):129-50

Bock KW, Lipp HP, Bock-Hennig BS.

Induction of drug-metabolizing enzymes by xenobiotics.

Xenobiotica. 1990 Nov;20(11):1101-11

Bock KW, Schirmer G, Green MD, Tephly TR.

Properties of a 3-methylcholanthrene-inducible phenol UDP-glucuronosyltransferase from rat liver.

Biochem Pharmacol. 1988 Apr 15;37(8):1439-43

Bock KW, Wiltfang J, Blume R, Ullrich D, Bircher J.

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

Eur J Clin Pharmacol. 1987;31(6):677-83.

Bock KW, Josting D, Lilienblum W, Pfeil H.

Purification of rat-liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase. Separation of two enzyme forms inducible by 3-methylcholanthrene or phenobarbital.

Eur J Biochem. 1979 Jul;98(1):19-26.

Bock KW, Frohling W, Remmer H, Rexer B.

Effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on substrate specificity of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase.

Biochim Biophys Acta. 1973 Nov 15;327(1):46-56

Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla, S, de Boer A, Oostra BA, Lindhout D, Tytgat GN, Jansen PL, Oude Elferink RP et al.

The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome.

N Engl J Med 1995;333(18):1171-1175

Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B, Bakker C, Oude ER, Chowdhury JR, Chowdhury NR, Jansen PL.

Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidation isoform in man.

J Biol Chem. 1994; 269: 17960-17964

Bosma PJ, Goldhoorn B, Oude Elferink RP, Sinaasappel M, Oostra BA, Jansen PL.

A mutation in bilirubin uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase isoform 1 causing Crigler-Najjar syndrome type II.

Gastroenterology. 1993 Jul;105(1):216-20

Bradford MM.

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

Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-54.

Brady JF, Li DC, Ishizaki H, Yang CS.

Effect of diallyl sulfide on rat liver microsomal nitrosamine metabolism and other monooxygenase activities.

Cancer Res. 1988 Nov 1;48(21):5937-40.

Brierley CH, Burchell B.

Human UDP-glucuronosyltransferases: chemical defense, jaundice and gene therapy

BioEssays. 1993 Nov;15 (11):749-754

Burchell B, Brierley CH, Monaghan G, Clarke DJ.

The structure and function of the UDP-glucuronosyltransferase gene family.

Adv Pharmacol. 1998;42:335-8.

Burchell B, Brierley CH, Rance D.

Specificity of human UDP-glucuronosyltransferases and xenobiotic glucuronidation.

Life Sci. 1995;57(20):1819-31

Burchell B, Nebert DW, Nelson DR, Bock KW, Iyanagi T, Jansen PL, Lancet D, Mulder GJ, Chowdhury JR, Siest G, Tephly TR, Mackenzie PI.

The UDP glucuronosyltransferase gene superfamily: suggested nomenclature based on evolutionary divergence.

DNA Cell Biol. 1991 Sep;10(7):487-94.

Burchell B, Coughtrie M, Jackson M, Harding D, Fournel-Gigleux S, Leakey J, Hume R.

Development of human liver UDP-glucuronosyltransferases.
Dev Pharmacol Ther. 1989;13(2-4):70-7.

Burnette WN.

"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.
Anal Biochem. 1981 Apr;112(2):195-203.

Chen F, Ritter JK, Wang MG, McBride OW, Lubet RA, Owens IS.

Characterization of a cloned human dihydrotestosterone/androstenediol UDP-glucuronosyltransferase and its comparison to other steroid isoforms.
Biochemistry. 1993 Oct 12;32(40):10648-57.

Cheng Z, Radomska-Pandya A, Tephly TR.

Cloning and expression of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A8. *Arch Biochem Biophys.* 1999 Aug 15;356(2):301-5.

Coffman BL, Rios GR, King CD, Tephly TR.

Human UGT2B7 catalyzes morphine glucuronidation.
Drug Metab Dispos. 1997 Jan;25(1):1-4.

Crawford JM, Gollan JL.

Hepatocyte cotransport of taurocholate and bilirubin glucuronides: role of microtubules.
Am J Physiol. 1988 Jul;255(1 Pt 1):G121-31.

Crigler JF, Najjar VA.

Congenital familial non-hemolytic jaundice with kernicterus.
Pediatrics. 1952;10: 169-80

Crivelli O, Lavarini C, Chiaberge E, Amoroso A, Farci P, Negro F, Rizzetto M.

Microsomal autoantibodies in chronic infection with the HBsAg associated delta agent.
Clin Exp Immunol. 1983 Oct;54(1):232-8.

Davis CD, Schut HA, Adamson RH, Thorgeirsson UP, Thorgeirsson SS, Snyderwine EG.

Mutagenic activation of IQ, PhIP and MeIQx by hepatic microsomes from rat, monkey and man: low mutagenic activation of MeIQx in cynomolgus monkeys in vitro reflects low DNA adduct levels in vivo.
Carcinogenesis. 1993 Jan;14(1):61-5.

Doll R, Peto R.

The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today.
J Natl Cancer Inst. 1981 Jun;66(6):1191-308.

Dutton GJ.

Glucuronidation of drugs and other compounds.
Boca Raton ,FL: CRC Press,.1980:3-268

Ebner T, Burchell B.

Substrate specificities of two stably expressed human liver UDP-glucuronosyltransferases of the UGT1 gene family.
Drug Metab Dispos. 1993 Jan-Feb;21(1):50-5

Emi Y, Ikushiro S, Iyanagi T.

Drug-responsive and tissue-specific alternative expression of multiple first exons in rat UDP-glucuronosyltransferase family 1 (UGT1) gene complex.
J Biochem (Tokyo). 1995 Feb;117(2):392-9.

Esumi H, Ohgaki H, Kohzen E, Takayama S, Sugimura T.

Induction of lymphoma in CDF1 mice by the food mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine.
Jpn J Cancer Res. 1989 Dec;80(12):1176-8.

Felton JS, Knize MG, Roper M, Fultz E, Shen NH, Turteltaub KW.

Chemical analysis, prevention, and low-level dosimetry of heterocyclic amines from cooked food.
Cancer Res. 1992 Apr 1;52(7 Suppl):2103s-2107s.

Fournel-Gigleux S, Sutherland L, Sabolovic N, Burchell B, Siest G.

Stable expression of two human UDP-glucuronosyltransferase cDNAs in V79 cell cultures.
Mol Pharmacol. 1991 Feb;39(2):177-83.

Fournel-Gigleux S, Jackson MR, Wooster R, Burchell B.

Expression of human liver cDNA encoding a UDP-glucuronosyltransferase catalysing the glucuronidation of hyodeoxycholic acid in cell culture.
FEBS Lett. 1989; 243(2):119-122

Gerhardsson de Verdier M, Hagman U, Peters RK, Steineck G, Overvik E.

Meat, cooking methods and colorectal cancer: a case-referent study in Stockholm.
Int J Cancer. 1991 Oct 21;49(4):520-5.

Gilbert L, Lereboullet P.

La cholamae simple familiale.
Sem. Med. 1901;21:241-248

Glatt H.

Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics.
Chem Biol Interact. 2000;129(1-2):141-170

Grams B, Harms A, Braun S, Strassburg CP, Manns MP, Obermayer-Straub P.

Distribution and inducibility by 3-methylcholanthrene of family 1 UDP-glucuronosyltransferases in the rat gastrointestinal tract.
Arch Biochem Biophys. 2000 May 15;377(2):255-65.

Green MD, Tephly TR.

Glucuronidation of amines and hydroxylated xenobiotics and endobiotics catalysed by expressed human UGT1.4 protein.

Drug Metab Disp. 1996;24:356-363

Green MD, Oturu EM, Tephly TR.

Stable expression of human liver UDP-glucuronosyltransferase (UGT2B15) with activity toward steroid and xenobiotic substrates.

Drug Metab Disp. 1994; 22:799-805

Grove AD, Llewellyn GC, Kessler FK, White KL Jr, Crespi CL, Ritter JK.

Differential protection by rat UDP-glucuronosyltransferase 1A7 against Benzo[a]pyrene-3,6-quinone- versus Benzo[a]pyrene-induced cytotoxic effects in human lymphoblastoid cells.

Toxicol Appl Pharmacol. 2000 Jan 1;162(1):34-43.

Guengerich FP, Parikh A, Johnson EF et al.,

Heterologous expression of human drug-metabolizing enzymes.

Drug Metab Disp. 1997; 25:1234-1241.

Guyonnet D, Siess MH, Le Bon AM, Suschetet M.

Modulation of phase II enzymes by organosulfur compounds from allium vegetables in rat tissues.

Toxicol Appl Pharmacol. 1999 Jan 1;154(1):50-8.

Hamada H, Kakunaga T.

Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome.

Nature. 1982 Jul 22;298(5872):396-8.

Harding D, Jeremiah SJ, Povey S, Burchell B.

Chromosomal mapping of a human phenol UDP-glucuronosyltransferase, UGT1.

Ann Hum Genet. 1990 Jan;54 (Pt 1):17-21.

Harding D, Fournel-Gigleux S, Jackson MR, Burchell B.

Cloning and substrate specificity of a human phenol UDP-glucuronosyltransferase expressed in COS-7 cells.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Nov;85(22):8381-5.

Hu Z, Wells PG.

Human interindividual variation in lymphocyte UDP-glucuronosyltransferases as a determinant of benzo(a)pyrene covalent binding and cytotoxicity.

Proc Int Soc Study Xenobiot. (ISSX) 1993;4:31

Hu Z, Wells PG.

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. 1992 Oct;263(1):334-42.

Ikushiro S, Emi Y, Iyanagi T.

Protein-protein interactions between UDP-glucuronosyltransferase isozymes in rat hepatic microsomes.

Biochemistry. 1997 Jun 10;36(23):7154-61.

Inscoe JK, Axelrod.

Some factors affecting glucuronid formation in vitro.

J Pharm Exp Ther 1960;129:128-131

Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA.

Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum.

EMBO J. 1990 Oct;9(10):3153-62.

Jansen PL, Mulder GJ, Burchell B, Bock KW.

New developments in glucuronidation research: report of a workshop on "glucuronidation, its role in health and disease".

Hepatology. 1992 Mar;15(3):532-44. Review. No abstract available.

Jedlitschky G, Cassidy AJ, Sales M, Pratt N, Burchell B.

Cloning and characterization of a novel human olfactory UDP-glucuronosyltransferase.

Biochem J. 1999 Jun 15;340 (Pt 3):837-43.

Jin CJ, Miners JO, Burchell B, Mackenzie PI.

The glucuronidation of hydroxylated metabolites of benzo[a]pyrene and 2-acetylaminofluorene by cDNA-expressed human UDP-glucuronosyltransferases. *Carcinogenesis.* 1993a Dec;14(12):2637-9.

Jin CJ, Miners JO, Lillywhite KJ, Mackenzie PI.

cDNA cloning and expression of two new members of the human liver UDP-glucuronosyltransferase 2B subfamily.

Biochem Biophys Res Commun. 1993b Jul 15;194(1):496-503.

Jin C, Miners JO, Lillywhite KJ, Mackenzie PI.

Complementary deoxyribonucleic acid cloning and expression of a human liver uridine diphosphate-glucuronosyltransferase glucuronidating carboxylic acid-containing drugs.

J Pharmacol Exp Ther. 1993c Jan;264(1):475-9.

Kawade N, Onishi S.

The prenatal and postnatal development of UDP-glucuronyltransferase activity towards bilirubin and the effect of premature birth on this activity in the human liver.

Biochem J. 1981 Apr 15;196(1):257-60.

Kim PM, Wells PG.

Genoprotection by UDP-glucuronosyltransferases in peroxidase-dependent, reactive oxygen species-mediated micronucleus initiation by the carcinogens 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and benzo[a]pyrene.

Cancer Res. 1996 Apr 1;56(7):1526-32.

Kinosaki M, Masuko T, Sogawa K, Iyanagi T, Yamamoto T, Hashimoto Y, Fujii-Kuriyama Y.

Intracellular localization of UDP-glucuronosyltransferase expressed from the transfected cDNA in cultured cells.

Cell Struct Funct. 1993 Feb;18(1):41-51.

Kwak MK, Kim SG, Kim ND.

Effects of garlic oil on rat hepatic P4502E1 expression.

Xenobiotica. 1995 Nov;25(10):1021-9.

Labrune P, Myara A, Hadchouel M, Ronchi F, Bernard O, Trivin F, Chowdhury NR, Chowdhury JR, Munnich A, Odievre M.

Genetic heterogeneity of Crigler-Najjar syndrome type I: a study of 14 cases.

Hum Genet. 1994 Dec;94(6):693-7.

Laemmli UK.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature. 1970 Aug 15;227(259):680-5.

Lazard D, Tal N, Rubinstein M, Khen M, Lancet D, Zupko K.

Identification and biochemical analysis of novel olfactory-specific cytochrome P-450IIA and UDP-glucuronosyl transferase.

Biochemistry. 1990 Aug 14;29(32):7433-40.

Lazard D, Zupko K, Poria Y, Nef P, Lazarovits J, Horn S, Khen M, Lancet D.

Odorant signal termination by olfactory UDP glucuronosyl transferase.

Nature. 1991 Feb 28;349(6312):790-3.

Leakey JE, Hume R, Burchell B.

Development of multiple activities of UDP-glucuronyltransferase in human liver.

Biochem J. 1987 May 1;243(3):859-61.

Lin J und Lu AY.

Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes.

Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2001;41:535-567

Mackenzie PI, Miners JO, McKinnon RA.

Polymorphisms in UDP glucuronosyltransferase genes: functional consequences and clinical relevance.

Clin Chem Lab Med. 2000 Sep;38(9):889-92.

Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Belanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF, Nebert DW.

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

Pharmacogenetics. 1997 Aug;7(4):255-69.

Mackenzie PI.

The UDP glucuronosyltransferase mutigene family.

Rev Biochem Toxicol. 1995;11:29-72

Matern H, Heinemann H, Matern S.

Radioassay of UDP-glucuronosyltransferase activities toward endogenous substrates using labeled UDP-glucuronic acid and an organic solvent extraction procedure.

Anal Biochem. 1994 Jun;219(2):182-8.

Meech R, Mackenzie PI.

Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases.

Clin Exp Pharmacol Physiol. 1997 Dec;24(12):907-15.

Meech R, Yogalingam G, Mackenzie PI.

Mutational analysis of the carboxy-terminal region of UDP-glucuronosyltransferase 2B1.

DNA Cell Biol. 1996 Jun;15(6):489-94.

Metz RP, Auyeung DJ, Kessler FK, Ritter JK.

Involvement of hepatocyte nuclear factor 1 in the regulation of the UDP-glucuronosyltransferase 1A7 (UGT1A7) gene in rat hepatocytes.

Mol Pharmacol. 2000 Aug;58(2):319-27.

Miyanaga K, Shimasaki S.

Structural and functional characterization of the rat follistatin (activin-binding protein) gene promoter.
Mol Cell Endocrinol. 1993 Mar;92(1):99-109.

Mojarrabi B, Butler R, Mackenzie PI.

cDNA cloning and characterization of the human UDP glucuronosyltransferase, UGT1A3.
Biochem Biophys Res Commun. 1996 Aug 23;225(3):785-90.

Monaghan G, Ryan M, Seddon R, Hume R, Burchell B.

Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome.
Lancet. 1996 Mar 2;347(9001):578-81.

Monaghan G, Clarke DJ, Povey S, See CG, Boxer M, Burchell B.

Isolation of a human YAC contig encompassing a cluster of UGT2 genes and its regional localization to chromosome 4q13.
Genomics. 1994 Sep 15;23(2):496-9.

Mucklow JC, Fraser HS, Bulpitt CJ, Kahn C, Mould G, Dollery CT.

Environmental factors affecting paracetamol metabolism in London factory and office workers.
Br J Clin Pharmacol. 1980 Jul;10(1):67-74.

Münzel PA, Lehmkoetter T, Bruck M, Ritter JK, Bock KW.

Aryl hydrocarbon receptor-inducible or constitutive expression of human UDP glucuronosyltransferase UGT1A6.
Arch Biochem Biophys. 1998 Feb 1;350(1):72-8.

Nagao M.

A new approach to risk estimation on food-borne carcinogens-heterocyclic amines-based on molecular information.
Mutat Res. 1999;431(1):3-12.

Naylor LH, Clark EM.

d(TG)n.d(CA)n sequences upstream of the rat prolactin gene form Z-DNA and inhibit gene transcription.
Nucleic Acids Res. 1990 Mar 25;18(6):1595-601.

Nebert DW.

Drug-metabolizing enzymes in ligand-modulated transcription.
Biochem Pharmacol. 1994 Jan 13;47(1):25-37.

Ohgaki H, Hasegawa H, Suenaga M, Sato S, Takayama S, Sugimura T.

Carcinogenicity in mice of a mutagenic compound, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) from cooked foods.
Carcinogenesis. 1987 May;8(5):665-8.

Ohgaki H, Kusama K, Matsukura N, Morino K, Hasegawa H, Sato S, Takayama S, Sugimura T.

Carcinogenicity in mice of a mutagenic compound, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, from broiled sardine, cooked beef and beef extract.

Carcinogenesis. 1984 Jul;5(7):921-4.

Orzechowski A, Schrenk D, Bock-Hennig BS, Bock KW.

Glucuronidation of carcinogenic arylamines and their N-hydroxy derivatives by rat and human phenol UDP-glucuronosyltransferase of the UGT1 gene complex.

Carcinogenesis. 1994 Aug;15(8):1549-53.

Owens IS, Ritter JK.

Gene structure at the UGT1 locus creates diversity in isozyme structure, substrate specificity and regulation.

Prog Nucl Acid Res and Mol Biol .1995;51, 305-338.

Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P, Oude Elferink RP.

Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene.

Science. 1996 Feb 23;271(5252):1126-8.

Peters WH, Kock L, Nagengast FM, Kremers PG.

Biotransformation enzymes in human intestine: critical low levels in the colon?

Gut. 1991 Apr;32(4):408-12.

Peters WH, Jansen PL.

Immunocharacterization of UDP-glucuronyltransferase isoenzymes in human liver, intestine and kidney.

Biochem Pharmacol. 1988 Feb 1;37(3):564-7.

Philipp T, Durazzo M, Trautwein C, Alex B, Straub P, Lamb JG, Johnson EF, Tukey RH, Manns MP.

Recognition of uridine diphosphate glucuronosyl transferases by LKM-3 antibodies in chronic hepatitis D.

Lancet. 1994 Aug 27;344(8922):578-81.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J.

Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990.

Int J Cancer. 1999; 80:827-841.

Renehan AG, Bach SP, Potten CS.

the relevance of apoptosis for cellular homeostasis and tumorigenesis in intestine.

Can J Gastroenterol. 2001; 15(3):166-176

Ritter JK, Chen F, Sheen YY, Tran HM, Kimura S, Yeatman MT, Owens IS.

A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol and other UDP-glucuronosyltransferase isoenzymes with identical carboxyl termini.

J Biol Chem. 1992; 267 (5):3257-3261

Ritter JK, Chen F, Sheen YY, Lubet RA, Owens IS.

Two human liver cDNAs encode UDP-glucuronosyltransferases with 2 log differences

in activity toward parallel substrates including hyodeoxycholic acid and certain estrogen derivatives.

Biochemistry. 1992b Apr 7;31(13):3409-14.

Ritter JK, Crawford JM, Owens IS.

Cloning of two human liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNAs with expression in COS-1 cells.

J Biol Chem. 1991 Jan 15;266(2):1043-7.

Rizzetto M, Swana G, Doniach D.

Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders.

Clin Exp Immunol. 1973 Nov;15(3):331-44.

Sabolovic N, Magdalou J, Netter P, Abid A.

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and phenols glucuronidation in Caco-2 cells: identification of the UDP-glucuronosyltransferases UGT1A6, 1A3 and 2B7.

Life Sci. 2000;67(2):185-96.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

Science. 1985 Dec 20;230(4732):1350-4.

Sanchezpozzi EJ, Catania VA, Rodriguezgaray EA, Mottino AD.

Enhancement of intestinal bilirubin UDP-glucuronosyltransferase activity by modification of microsomal lipid composition.

Biochim Biophys Acta 1995;1245:293-298

Seppen J, Bosma PJ, Goldhoorn BG, Bakker CT, Chowdhury JR, Chowdhury NR, Jansen PL, Oude Elferink RP.

Discrimination between Crigler-Najjar type I and II by expression of mutant bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase.

J Clin Invest. 1994 Dec;94(6):2385-91.

Sim E, Payton M, Noble M, Minchin R.

An update on genetic, structural and functional studies of arylamine-N-acetyltransferases in eucaryotes and procaryotes.

Hum Mol Genet. 2000;16:2435-2441

Strassburg CP, Manns MP.

Jaunice, genes and promoters

J Hepatol. 2000;33:476-479

Strassburg CP, Kneip S, Topp J, Obermayer-Straub P, Barut A, Tukey RH, Manns MP.

Polymorphic gene regulation and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine. *J Biol Chem.* 2000 Nov 17;275(46):36164-71.

Strassburg CP, Nguyen N, Manns MP, Tukey RH.

UDP-glucuronosyltransferase activity in human liver and colon. *Gastroenterology.* 1999a Jan;116(1):149-60.

Strassburg CP, Strassburg A, Nguyen N, Li Q, Manns MP, Tukey RH.

Regulation and function of family 1 and family 2 UDP-glucuronosyltransferase genes (UGT1A, UGT2B) in human oesophagus. *Biochem J.* 1999b Mar 1;338 (Pt 2):489-98.

Strassburg CP, Nguyen N, Manns MP, Tukey RH.

Polymorphic expression of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A gene locus in human gastric epithelium. *Mol Pharmacol.* 1998a Oct;54(4):647-54.

Strassburg CP, Manns MP, Tukey RH.

Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8. *J Biol Chem.* 1998b Apr 10;273(15):8719-26.

Strassburg CP, Manns MP, Tukey RH.

Differential down-regulation of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus is an early event in human liver and biliary cancer. *Cancer Res* 1997a July 15; 57:2979-2985

Strassburg CP, Oldhafer K, Manns MP, Tukey RH.

Differential expression of the UGT1A locus in human liver, biliary, and gastric tissue: Identification of UGT1A7 and UGT1A10 transcripts in extrahepatic tissue. *Mol Pharmacol.* 1997b; 52: 212-220

Strassburg CP, Obermayer-Straub P, Alex B, Durazzo M, Rizzetto M, Tukey RH, Manns MP.

Autoantibodies against glucuronosyltransferases differ between viral hepatitis and autoimmune hepatitis. *Gastroenterology.* 1996 Dec;111(6):1576-86.

Strasser SI, Smid SA, Mashford ML, Desmond PV.

Sex hormones differentially regulate isoforms of UDP-glucuronosyltransferase. *Pharm Res.* 1997 Sep;14(9):1115-21.

Stremmel W, Diede HE.

Cellular uptake of conjugated bilirubin and sulfobromophthalein (BSP) by the human hepatoma cell line Hep G2 is mediated by a membrane BSP/bilirubin binding protein. *J Hepatol.* 1990 Jan;10(1):99-104.

Tephly TR, Burchell B.

UDP-glucuronosyltransferases: a family of detoxifying enzymes.
Trends Pharmacol Sci. 1990 Jul;11(7):276-9.

Tukey RH, Strassburg CP.

Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract.
Mol Pharmacol. 2001;59(3):405-414

Tukey RH, Strassburg CP.

Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease.
Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2000;40:581-616.

Turteltaub KW, Knize MG, Buonarati MH, McManus ME, Veronese ME, Mazrimas JA, Felton JS.

Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine (PhIP) by liver microsomes and isolated rabbit cytochrome P450 isozymes.
Carcinogenesis. 1990 Jun;11(6):941-6.

Vienneau DS, DeBoni U, Wells PG.

Potential genoprotective role for UDP-glucuronosyltransferases in chemical carcinogenesis: initiation of micronuclei by benzo(a)pyrene and benzo(e)pyrene in UDP-glucuronosyltransferase-deficient cultured rat skin fibroblasts.
Cancer Res. 1995 Mar 1;55(5):1045-51.

Vogelstein B, Gillespie D.

Preparative and analytical purification of DNA from agarose.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Feb;76(2):615-9.

Wakabayashi K, Nagao M, Esumi H, Sugimura T.

Food-derived mutagens and carcinogens.
Cancer Res. 1992 Apr 1;52(7 Suppl):2092s-2098s.

Walle T, Otake Y, Galijatovic A, Ritter JK, Walle UK.

Induction of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by the flavonoid chrysin in the human hepatoma cell line hep G2.
Drug Metab Dispos. 2000 Sep;28(9):1077-82.

Walle T, Walle UK, Cowart TD, Conradi EC, Gaffney TE.

Selective induction of propranolol metabolism by smoking: additional effects on renal clearance of metabolites.
J Pharmacol Exp Ther. 1987 Jun;241(3):928-33.

Wargovich MJ.

Experimental evidence for cancer preventive elements in foods.
Cancer Lett. 1997 Mar 19;114(1-2):11-7.

Wooster R, Sutherland L, Ebner T, Clarke D, Da Cruz e Silva O, Burchell B.
Cloning and stable expression of a new member of the human liver
phenol/bilirubin: UDP-glucuronosyltransferase cDNA family.
Biochem J. 1991 Sep 1;278 (Pt 2):465-9.

Yueh MF, Nguyen N, Strassburg CP, Oda Y, Guengerich FP, Tukey RH.
The contribution of UDP-glucuronosyltransferase 1A9 on CYP1A2-mediated
genotoxicity by aromatic and heterocyclic amines.
Carcinogenesis 2001, im Druck

5.2 DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert (STR493/3-1) und in in der Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie unter der Leitung von *Prof. Dr. Michael.P. Manns* angefertigt, dem ich für die Bereitstellung der ausgezeichneten Laborausstattung danke.

Mein besonderer Dank gilt *PD Dr. Christian P. Strassburg*, der mir dieses interessante Thema überlassen hat. Er hat meine Arbeit mit großem Engagement betreut und dadurch entscheidend zu ihrem Gelingen beigetragen.

Für die Vertretung der Arbeit vor dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover danke ich *Herrn Prof. Dr.Walter H. Müller* sehr herzlich.

Nicht zuletzt werden die Höhen und Tiefen jeder Arbeit durch ein gutes Team getragen. Hier möchte ich mich ganz besonders bei *Dr. Heike Liermann, Nikolina Kezmic* und bei *Anne Kayser* für ihre freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Für die technische Unterstützung möchte ich *Ayse Barut, Dr. Heiner Wedemeyer, Dr. Petra Obermayer-Straub, Susanne Kneip, Andrea Harms, Steffanie Loges* und den Mitarbeitern des „alten Labors“ herzlich danken.

5.3 LEBENS LAUF

Juliane Topp

geboren am 9.6.1966
in Höxter

AKADEMISCHE TÄTIGKEITEN

12/1998-11/2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Gastroenterologie und
Hepatology der Medizinischen Hochschule Hannover
seit 9/98 Dozentin an den Therapeutischen Lehranstalten Minden

HOCHSCHULSTUDIUM

10/92 - 11/97 Humanbiologie an der Universität Marburg
Abschluss: Diplom-Humanbiologin

PRAKTIKUM UND TÄTIGKEIT NEBEN DEM STUDIUM

7.8.95-29.9.95 Industriepraktikum in der Abteilung präklinische Forschung
der Behringwerke AG, Marburg
1.1.97-30.6.98 Studentische Hilfskraft im Institut für Molekularbiologie und
Tumorforschung, Marburg

BERUFS AUSBILDUNG UND TÄTIGKEITEN VOR DEM STUDIUM

6/92 - 9/92 Ergotherapeutin am Landeskrankenhaus Paderborn
6/91 - 5/92 Ergotherapeutin an der Psychiatrischen Klinik der Uni Bonn
4/88 - 3/91 Ausbildung zur Ergotherapeutin am Annastift in Hannover
9/87 - 3/88 Berufsgrundschuljahr Holz in Brakel
5/87 - 8/87 Saisonarbeit in einem Hotel auf Borkum
10/86-3/87 Sozialpädagogikstudium an der Uni Osnabrück (1 Semester)
4/86 - 9/86 Praktikum in einer Ergotherapieabteilung in Bad Wildungen
9/85 - 3/86 Freiwilliges Soziales Jahr im Kinderdorf Johannesstift, Vechta

SCHULBILDUNG

1982 - 1985 Gymnasium Höxter, Abschluss: Abitur
1976 - 1982 Realschule Brakel
1972 - 1976 Grundschule Ottbergen