

**Molekulare Mechanismen der
Umwelt-Gen-Interaktionen in der mukosalen
Barriere des Gastrointestinaltraktes**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz
Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Sandra Kalthoff
geboren am 11.10.1979 in Aurich

Hannover, 2010

Referent: Prof. Dr. Christian Straßburg

Korreferent: Prof. Dr. Helge Küster

Tag der Promotion: 09.04.2010

Zusammenfassung

Durch die Nahrung wird der Gastrointestinaltrakt regelmäßig potentiell toxischen oder karzinogenen Substanzen ausgesetzt. Einen wichtigen Schutzmechanismus stellt die Aktivierung von UDP-Glukuronosyltransferasen (UGT) dar, die eine Vielzahl von oxidierten Metaboliten, karzinogenen Verbindungen und wasserunlöslichen Medikamenten glukuronidieren und damit ihre Ausscheidung aus dem Körper in der Wasserphase über Urin und Galle ermöglichen. Die Glukuronidierungsleistung eines Individuums kann durch Polymorphismen im *UGT*-Genlocus beeinflusst werden. Die *UGT1A1**28-Variante ist z.B. mit dem Gilbert-Meulengracht-Syndrom und die *UGT1A7**3-Variante mit einem erhöhten Risiko für das hepatozelluläre Karzinom (HCC) assoziiert.

Die Regulation der Gene innerhalb des *UGT1A7-10* Clusters ist bis heute nur unzureichend geklärt. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die extrahepatisch exprimierten *UGT1A8*- und *UGT1A10*-Gene koordiniert durch die Transkriptionsfaktoren Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) und Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (Nrf2) reguliert werden, während das hepatisch exprimierte *UGT1A9*-Gen durch AhR, aber unabhängig von Nrf2 reguliert wird.

In vielen Studien wurde demonstriert, dass Kaffeetrinker ein vermindertes Risiko aufweisen, an einem HCC zu erkranken und dass bei ihnen die Leberentzündung (Aminotransferasenerhöhung) sowie die Progression zur Leberzirrhose vermindert ist. Da *UGT1A*-Gene durch Xenobiotika heraufreguliert werden können, wurde der Einfluss von täglich konsumierten Getränken wie Kaffee auf die *UGT1A*-Expression untersucht. Dabei zeigte sich, dass alle *UGT1A*-Gene durch Kaffee induziert werden können, das Ausmaß der Induktion allerdings von der Kaffeeart, der Zubereitungsart und dem jeweiligen *UGT1A*-Gen abhängig ist. Weiterhin wurden die für die Kaffeinduktion verantwortlichen vermittelnden Transkriptionsfaktoren AhR und Nrf2 sowie deren Bindungselemente in verschiedenen *UGT1A*-Promotoren identifiziert. Die Heraufregulierung der detoxifizierenden *UGT1A*-Proteine repräsentiert damit eine plausible molekulare Erklärung für die Verminderung des HCC-Risikos und des Risikos von entzündlichen Lebererkrankungen bei Kaffeetrinkern. Weiterhin wäre in Patienten mit Gilbert-Meulengracht-Syndrom eine *UGT1A1*-Induktion durch Kaffee denkbar, so dass das Defizit in der Bilirubin-Eliminierung eventuell ganz oder teilweise

durch eine pharmakologische Intervention durch Kaffee-Genuss aufgehoben werden könnte.

Durch einen kürzlich neu entdeckten Splicing-Mechanismus kommt es zur Generierung von mehreren Transkriptvarianten eines jeden *UGT1A*-Gens. Die daraus resultierenden neuen *UGT1A*-Proteinvarianten wirken als negative Modulatoren der Konjugationsaktivität der *UGT1A*-Proteine. Die in der Studie von *Girard et al. (Pharmacogenet Genomics, 2007)* beschriebene *UGT1A*-Transkriptvarianten-Verteilung in verschiedenen humanen Geweben wurde mit der Expression von verschiedenen Transkriptvarianten in einem humanisierten transgenen *UGT1A*-Mausmodell verglichen. Weiterhin wurde mit Hilfe einer humanisierten *tgUGT1A-SNP*-Mauslinie, die im humanen *UGT1A*-Lokus zehn häufig in der Bevölkerung vorkommende Polymorphismen aufwies, gezeigt, dass Polymorphismen nicht nur einen Einfluss auf die Höhe der transkriptionellen Regulation einzelner Gene, sondern auch auf die Verteilung von Splicing-Transkriptvarianten in einzelnen Organen haben.

Schlagwörter:

- UDP-Glukuronosyltransferasen
- Xenobiotika
- Oxidativer Stress

Abstract

The gastrointestinal tract is exposed to a number of potentially toxic or carcinogenic substances. The activation of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs), which glucuronidate a variety of oxidized metabolites, carcinogenic compounds and drugs facilitating their elimination from the body, represents an important defense mechanism. The individual glucuronidation capacity is influenced by polymorphisms within the *UGT* gene locus. The *UGT1A1*28* variant is associated with Gilbert's syndrome and the genetic variant *UGT1A7*3* is associated with an increased risk for the development of hepatocellular carcinoma (HCC).

To date, little is known regarding the regulation of the genes within the *UGT1A7-10* cluster. In this study, we show that *UGT1A8* and *UGT1A10*, which are expressed in the extrahepatic gastrointestinal tract, are co-ordinately regulated by the transcription factors aryl hydrocarbon receptor (AhR) and the nuclear factor erythroid-related factor

2 (Nrf2), while the liver-expressed *UGT1A9* gene is regulated by AhR, but is independent of the presence of Nrf2.

Several studies have shown that coffee drinkers have a decreased risk for HCC and inflammatory liver diseases, as well as fibrosis progression. It is known that *UGT1A* genes are upregulated by xenobiotics. Therefore, the influence of daily consumed beverages such as coffee on the expression of *UGT1A* was examined. Every *UGT1A* gene was induced by coffee, but the extent of the induction was dependent on the type of coffee, the mode of preparation, and on the respective *UGT1A* gene. In addition, the responsible transcription factors mediating coffee-associated induction, AhR and Nrf2, as well as their DNA binding elements in different *UGT1A* promoters were identified and characterized. The upregulation of the detoxifying UGT1A proteins is likely to contribute to the decreased risk for HCC and other hepatic diseases in coffee drinkers. Furthermore, UGT1A1 induction by coffee may represent an attractive pharmacological intervention strategy in patients with Gilbert's syndrome that may result in a normalization or improvement of serum unconjugated bilirubin levels.

A recently discovered new splicing mechanism leads to the generation of different transcript variants of every *UGT1A* gene. The resulting new protein variants act as negative modulators of the conjugation activity of the previously known UGT1A proteins. The distribution of the UGT1A transcripts in different human tissues (*Girard et al., Pharmacogenet Genomics, 2007*) was compared to the expression of different transcript variants in a humanized transgenic *UGT1A* mouse model. In addition, it was shown in a humanized *tgUGT1A-SNP* mouse line containing ten frequently occurring polymorphisms within the *UGT1A* locus, that polymorphisms do not only have an influence on the expression quantity but also on the distribution of transcript variants in different organs.

Key words:

- UDP-glucuronosyltransferases
- Xenobiotics
- Oxidative stress

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Funktionen der gastrointestinalen Barriere und der Leber	1
1.2	Mechanismen des Xenobiotika-Metabolismus zur Bekämpfung von toxischen und karzinogenen Effekten	2
1.3	UDP-Glukuronosyltransferasen	3
1.4	Expression, Polymorphismen und Bedeutung der <i>UGT1A1</i> -, <i>UGT1A7</i> -, <i>UGT1A8</i> -, <i>UGT1A9</i> - und <i>UGT1A10</i> -Gene	8
1.5	Der Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (Nrf2) als Sensor von oxidativem Stress und der durch Xenobiotika aktivierte Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR)	11
1.6	Kaffee und seine antioxidative Wirkung	13
1.7	Tee, Kakao sowie ihre chemopräventive Wirkung	16
1.8	Zielsetzung	17
2.	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Genomische DNA von gesunden Blutspendern und HCC-Patienten	19
2.1.2	Humane Zelllinien	19
2.1.3	Humanisierte transgene <i>UGT1A-WT</i> - und <i>UGT1A-SNP</i> -Mauslinie	19
2.1.4	Plasmide	20
2.1.5	Oligonukleotide	20
2.1.6	siRNA	26
2.1.7	Enzyme und dNTPs	27
2.1.8	DNA- und Protein-Marker	27
2.1.9	Antikörper	27
2.1.10	Bakterienstämme und Medien für die Kultivierung	28
2.1.11	Medien und Reagenzien für die Zellkultur	28
2.1.12	Induzierende Substanzen	29
2.1.13	Kits	31
2.1.14	Puffer und Gebrauchslösungen	31
2.1.15	Chemikalien	33

2.1.16	Verbrauchsmaterialien	34
2.1.17	Sonstige Materialien	34
2.1.18	Geräte	35
2.2	Methoden	36
2.2.1	DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.2.2	Mutagenese von potentiellen DNA-Bindungselementen	38
2.2.3	Agarosegelelektrophorese	39
2.2.4	Aufreinigung von PCR- und Restriktionsfragmenten aus Agarosegelen	39
2.2.5	Aufreinigung von PCR-Fragmenten mittels NucleoSpin [®] Extract II Kit	39
2.2.6	Enzymatische Reaktionen bei der DNA-Klonierung	40
2.2.7	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	40
2.2.8	Chemische Transformation	41
2.2.9	Klonanalyse	41
2.2.10	Plasmidisolierung und DNA-Konzentrationsbestimmung	42
2.2.11	DNA Sequenzierung und Sequenzanalysen	42
2.2.12	Zellkultur	43
2.2.13	RNA-Isolierung	44
2.2.14	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	44
2.2.15	TaqMan PCR	45
2.2.16	Luciferase Assay	47
2.2.17	Herstellung von nukleären Extrakten	49
2.2.18	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	49
2.2.19	Herstellung von Mikrosomen	52
2.2.20	Western Blot	53
2.2.21	Behandlung der humanisierten transgenen <i>UGT1A</i> -WT-Mäuse mit Kaffee	54
2.2.22	Biostatistik	55
3.	Ergebnisse	56
3.1	Identifizierung potentieller Polymorphismen in der 5'-upstream Sequenz von <i>UGT1A10</i>	56

3.2	Charakterisierung der transkriptionellen Regulation von <i>UGT1A8</i> , <i>UGT1A9</i> und <i>UGT1A10</i> durch die Transkriptionsfaktoren AhR und Nrf2	56
3.2.1	Zeitabhängige Induzierbarkeit der humanen <i>UGT1A10</i> -mRNA und eines <i>UGT1A10</i> -Reportergenkonstruktes durch TCDD (AhR) und <i>t</i> BHQ (Nrf2)	56
3.2.2	Identifizierung von XRE- und ARE-Bindungsstellen in der <i>UGT1A10</i> 5'-upstream Region	58
3.2.3	TCDD- und <i>t</i> BHQ-Induzierbarkeit der hoch homologen <i>UGT1A8</i> und <i>UGT1A9</i> und Identifizierung der vermittelnden XRE- und ARE-Bindungsstellen	59
3.2.4	Eine gleichzeitige Behandlung des <i>UGT1A10</i> -Reportergenkonstruktes mit TCDD und <i>t</i> BHQ führt zu keinem synergetischen Effekt	62
3.2.5	Einfluss einer Mutagenese der <i>UGT1A10</i> -ARE-149-Bindestelle entsprechend der <i>UGT1A9</i> -ARE-143-Sequenz auf die TCDD- und <i>t</i> BHQ-Induzierbarkeit	63
3.2.6	Einfluss einer Mutagenese der <i>UGT1A9</i> -ARE-143-Bindestelle entsprechend der <i>UGT1A10</i> -ARE-149-Sequenz auf die TCDD- und <i>t</i> BHQ-Induzierbarkeit	64
3.2.7	siRNA vermittelter Knockdown von AhR und Nrf2 und dessen Einfluss auf die TCDD- und <i>t</i> BHQ-Induzierbarkeit von <i>UGT1A8</i> , <i>UGT1A9</i> und <i>UGT1A10</i>	65
3.2.8	Spezifität der TCDD und <i>t</i> BHQ vermittelten Induktion und die der verwendeten AhR- und Nrf2-siRNA	68
3.2.9	Bestätigung der Bindung von AhR und Nrf2 an die XRE- und ARE-Bindungsstellen im <i>UGT1A10</i> -Promotor mit Hilfe von Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs)	69
3.3	Die Modulation der UGT1A-Expression durch Kaffee, Kakao und Tee im Zellkultursystem und in der humanisierten <i>tgUGT1A-WT</i> -Maus	73
3.3.1	Heraufregulierung verschiedener UGT1A-Isoformen durch Kaffee	73
3.3.2	Luciferase-Assay-basierte UGT1A-Kaffeeinduktion in HepG2- und CaCo2-Zellen	75

3.3.3	Induktion von <i>UGT1A1</i> , <i>UGT1A7</i> , <i>UGT1A10</i> und der Genvarianten <i>UGT1A1*28</i> und <i>UGT1A7*12</i> durch verschiedene Kaffee- und Teearten sowie durch Kakao	76
3.3.4	Suche nach den vermittelnden Substanzen der Kaffee-Induktion: Behandlung mit Methylxanthinen und Kaffeelipiden	79
3.3.5	Identifizierung der Kaffeeinduktions-vermittelnden Bindungselemente im <i>UGT1A1</i> -, <i>UGT1A7</i> - und <i>UGT1A10</i> -Promotor	80
3.3.6	Einfluss eines AhR- und Nrf2-Knockdowns auf die <i>UGT1A1</i> -, <i>UGT1A7</i> - und <i>UGT1A10</i> -Induzierbarkeit durch Kaffee	83
3.3.7	UGT1A-mRNA-Induktion in HepG2-, CaCo2- und KYSE70-Zellen	85
3.3.8	Kaffee vermittelte Aktivierung von AhR und Nrf2	87
3.3.9	Kaffee vermittelte UGT1A-Regulation im humanisierten <i>tgUGT1A-WT</i> -Mausmodell	88
3.4.	Charakterisierung der verschiedenen UGT1A-Transkriptvarianten (<i>v1/v2/v3</i>) im humanisierten <i>tgUGT1A</i> -Mausmodell und der Einfluss von SNPs auf die Expression der Varianten	90
4.	Diskussion	95
4.1	Hohe Konservierung der <i>UGT1A10</i> -Promotorsequenz	95
4.2	Bedeutung der <i>UGT1A8</i> - und <i>UGT1A10</i> -Gene als indirekte Antioxidantien: Koordinierte Regulation durch den ROS-aktivierten Transkriptionsfaktor Nrf2 und den Xenobiotika-aktivierten Transkriptionsfaktor AhR	95
4.3	Kaffee als Modulator der Glukronidierungsaktivität und seine Bedeutung für das Gilbert-Meulengracht-Syndrom und eine HCC-Entwicklung	99
4.4	Vergleich der UGT1A-Transkriptvarianten-Verteilung in Mensch und in der humanisierten <i>tgUGT1A</i> -Maus und der Einfluss von SNPs auf die Expression von UGT1A-Transkriptvarianten	103
	Literaturverzeichnis	106
	Abbildungsverzeichnis	113
	Lebenslauf	117

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor
ARE	Antioxidant Response Element
Arnt	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
AS	Aminosäure
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
BAC	bacterial artificial clone
BaP	Benzo(α)pyren
bp	Basenpaar
bZIP	Basic Leucin Zipper
bzw	beziehungsweise
ca	circa
°C	Grad Celsius
Cdx2	Caudal-related Homeodomain Protein2
CI	Confidence interval
C-terminal	Carboxyl-terminal
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CYP	Cytochrom P450
d.h.	das heißt
DMBA	7,12-Dimethylbenz[α]anthracen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosintriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EGCG	Epigallocatechin-3-Gallat
et al	et altera
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	Foetal Bovine Serum
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
g	Gramm
GCS	γ -Glutamylcystein Synthetase

Abkürzungsverzeichnis

GPx	Glutathionperoxiddase
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine-1-ethanesulfonic acid
HNF1 α	Hepatocyte Nuclear Factor 1 alpha
HSP90	Heat Shock Protein 90
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasenpaare
LB-Medium	Vollmedium nach Luria und Bertani
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Kinasen
mg	Milligramm
MGB	Minor Groove Binder
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
NADPH	Nicotin-Amid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NQO1	NADP(H)-Quinon Oxidoreduktase
Nrf2	Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2
OD	Optische Dichte
OR	Odds Ratio
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PhIP	2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazol[4,5- β]Pyridin
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-activated Receptor
RLE	Relative Lichteinheiten
RNA	Ribonucleic acid

Abkürzungsverzeichnis

rpm	Rounds per minute
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOD	Superoxid-Dismutase
sec	Sekunde
siRNA	small interfering RNA
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-rhodamine
<i>t</i> BHQ	<i>tert</i> -Butylhydroquinon
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-Dioxin
TGF- β 1	Transforming Growth Factor- β 1
Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethanhydrochlorid
U	Enzymeinheit Unit
UDP	Uridin-5'-Diphosphat
UGT	UDP-Glukuronosyltransferase
URS	Upstream Regulatory Sequence
UV	Ultra Violett
WT	Wildtyp
XAP2	X-associated Protein 2
XRE	Xenobiotic Response Element

1. Einleitung

1.1 Funktionen der gastrointestinalen Barriere und der Leber

Der Gastrointestinaltrakt ist elementar für die Aufnahme von Nährstoffen und Flüssigkeit, repräsentiert aber auch die größte Oberfläche des Körpers mit Kontakt zur externen Umwelt. Damit stellt der Gastrointestinaltrakt die erste Barriere für exogene Substanzen aus der Nahrung oder oral verabreichte Medikamente dar, die, um absorbiert und im ganzen Körper verteilt zu werden, zuerst das intestinale Epithelium passieren müssen. Damit potentiell toxische oder karzinogene Xenobiotika keine Schäden verursachen können, existieren sogenannte Detoxifizierungssysteme innerhalb der gastrointestinalen Barriere, die potentielle toxische Xenobiotika entgiften. In der Pharmakologie ist es darüberhinaus von Bedeutung, dass Medikamente während der Biotransformation und des intestinalen Transportes die gastrointestinale Barriere effizient und ohne Funktionsverlust passieren können. Der xenobiotische Metabolismus umfasst drei prinzipielle Phasen: Die Phase I Reaktionen, die hauptsächlich von Cytochrom P450 (CYP) Enzymen durchgeführt werden, resultieren in einer Oxidierung, bei der gewöhnlich eine reaktive Gruppe (z.B. ein Hydroxyl-Radikal) an ein Molekül geheftet wird. Dabei können als Konsequenz reaktive Moleküle entstehen, die toxischer als das Ausgangsmolekül sind. In der Phase II (Konjugationsreaktionen) werden die reaktiven Moleküle durch meist detoxifizierende Enzyme über die funktionellen Gruppen mit wasserlöslichen Molekülen konjugiert. Die entstandenen hydrophilen Konjugate werden danach in der Phase III mit Hilfe von Transportproteinen aus der Zelle geschleust und schließlich über Galle oder Urin vom Körper ausgeschieden (1,2).

Die Moleküle, die die gastrointestinale Barriere überqueren und ins Blut gelangen, werden zur Leber transportiert. Die Leber repräsentiert als größte Verdauungsdrüse eines der wichtigsten Organe für die Entgiftung und für den Stoffwechsel von exogenen und endogenen Substanzen. In der Leber werden daher viele Medikamente durch Phase I und II Enzyme metabolisiert, um sie so zu entgiften, wodurch eine systemische toxische Wirkung verhindert werden kann, aber auch ein Wirkungsverlust einzelner Pharmaka auftreten kann (First-Pass-Metabolismus). Weiterhin wird das beim Hämoglobin-Abbau entstehende hydrophobe Bilirubin in der Leber (und an ausgewählten extrahepatischen Orten) durch das Phase II Enzym UDP-

Glukuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) glukuronidiert und das daraus entstehende hydrophile, konjugierte Bilirubin über die Galle, die in den Darm abgegeben wird, schließlich mit dem Stuhl ausgeschieden.

1.2 Mechanismen des Xenobiotika-Metabolismus zur Bekämpfung von toxischen und karzinogenen Effekten

Als Hauptorte für den Erstkontakt mit Xenobiotika sind der Gastrointestinaltrakt und nachfolgend die Leber kontinuierlich einem breiten Spektrum von Substanzen ausgesetzt, die im Phase I-Stoffwechsel oxidiert und mit reaktiven prosthetischen Gruppen versehen werden. Dabei kann es auch zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) kommen. Unter normalen physiologischen Bedingungen werden ROS als Nebenprodukte des Stoffwechsels gebildet, führen aber zu keiner Schädigung der Zellen. Eine erhöhte Konzentration von ROS in der Zelle kann jedoch zu oxidativem Stress und Zellschädigung führen. Im Laufe der Evolution haben Säugerzellen eine Vielfalt von induzierbaren genetischen Programmen entwickelt, um sich den vorherrschenden ROS-Konzentrationen anzupassen. Als erste zelluläre Reaktion auf oxidativen/elektrophilen Stress wird eine Reihe von Abwehrgenen aktiviert, was unter normalen Umständen zur Neutralisation des oxidativen Stresses, seiner Auswirkungen und schließlich zum Überleben der Zelle führt (3,4). Beim Versagen von angemessenen Abwehrmechanismen kann die Akkumulation von ROS und elektrophilen Molekülen zu Membran- und DNA-Schäden, Mutagenese, Gewebedegeneration, vorzeitigem Altern, Apoptose, zellulärer neoplastischer Transformation und Krebs führen (5-7).

Die zelluläre antioxidative Abwehr beinhaltet eine Anzahl von Proteinen (z.B. Enzyme) und kleinen Molekülen (z.B. Vitamin C und E), die ROS auf einem Niveau halten, das für den Organismus ungefährlich ist. Zu den Enzymen, die mittels ihrer antioxidativen Fähigkeiten ROS inaktivieren und damit ROS-initiierte Reaktionen verhindern, gehören Superoxid-Dismutasen (SOD), Katalasen und Glutathionperoxidasen (GPx). Diese Enzyme gehören zu der Gruppe der „direkten“ Antioxidantien (8-10). Dahingegen werden detoxifizierende (konjugierende) Phase II Enzyme basierend auf ihrer Rolle in der Aufrechterhaltung der Redox-Balance und der Thiol-Homöostase als „indirekte“ Antioxidantien klassifiziert. Sie tragen zu der

Biosynthese und dem Recycling von Thiol bei oder erleichtern durch Reduktion/Konjugation während des Prozesses der xenobiotischen Detoxifizierung die Ausscheidung von reaktiven sekundären Metaboliten (Chinone, Epoxide, Aldehyde, Peroxide) (11). Zu den Phase II Enzymen mit antioxidativen Fähigkeiten gehören Glutathion S-Transferasen (GST), NADP(H)-Quinon Oxidoreduktase (NQO1), γ -Glutamylcystein Synthetase (GCS) und UDP-Glukuronosyltransferasen (UGT).

1.3 UDP-Glukuronosyltransferasen (UGTs)

UGTs werden in Leber, Magen, Ösophagus, Gallengängen, Dün- und Dickdarm, Lunge, Niere, Hirn und Brustgewebe exprimiert. Sie sind in der inneren Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert und katalysieren die Umwandlung von lipophilen xenobiotischen und endobiotischen Substanzen zu hydrophilen, gewöhnlich inaktiven Glukuroniden, die leicht über die Galle oder den Urin ausgeschieden werden können (12). Diese Glukuronidierungsreaktion erfolgt durch eine Bindung von UDP-Glukuronsäure an das jeweilige Substrat (Konjugation). Unter den Substraten der UGTs finden sich viele reaktive Moleküle, die während der Phase I von Cytochrom P450 Enzymen oxidiert wurden. Unter anderem werden Nahrungsbestandteile, endogene Metabolite, Hormone, aber auch Medikamente und Umweltkarzinogene von UGTs katalysiert (13-16).

Genetische Organisation

Die humane UGT-Superfamilie besteht aus vier UGT-Familien: UGT1, UGT2, UGT3 und UGT8. Allerdings spielen ausschließlich Enzyme der Familien UGT1 und UGT2, die UDP-Glukuronsäure als Glykosyldonor verwenden, eine signifikante Rolle in der Biotransformation (17). *UGT2*-Gene befinden sich auf Chromosom 4q13 und 4q28, bestehen aus sechs Exons und glukuronidieren vorwiegend endobiotische Substrate wie Steroide oder Gallensäuren. Der *UGT1A*-Lokus hingegen ist auf Chromosom 2q37 lokalisiert und beinhaltet neun Gene, die für funktionelle UGT1A-Proteine kodieren, (*UGT1A1*, *UGT1A3*, *UGT1A4*, *UGT1A5*, *UGT1A6*, *UGT1A7*, *UGT1A8*, *UGT1A9*, *UGT1A10*) und 3 Pseudogene (*UGT1A2P*, *UGT1A11P*, *UGT1A12P*). Letztere werden als Pseudogene betrachtet, weil sie im Exon 1 ein bis mehrere Deletionen aufweisen, die die Transkription und Translation eines funktionellen UGT1A-Proteins

verhindern (18). Die Nomenklatur der *UGT1A*-Gene richtet sich nach der Position des Gens im *UGT1A*-Lokus. Dabei liegt *UGT1A12P* am 5'-Ende und *UGT1A1* am 3'-Ende (Abb.1) (17). Später wurde festgestellt, dass *UGT1A8* nicht zwischen *UGT1A7* und *UGT1A9*, sondern stromaufwärts von *UGT1A10* liegt. Dennoch wurde die Nomenklatur deswegen nicht geändert. Der gesamte *UGT1A* Locus umfasst etwa 200 kbp und ist aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen verschiedenen UGTs sehr wahrscheinlich durch Genduplikationsereignisse entstanden. Bezogen auf die Sequenzhomologie gibt es innerhalb der *UGT1A*-Familie zwei Cluster: das *UGT1A3-5* Cluster und das *UGT1A7-10* Cluster. Die Gene des *UGT1A7-10* Clusters weisen im Exon 1 eine Sequenzhomologie von mehr als 70% und eine Promotorsequenzhomologie von mehr als 75% auf (18). Alle *UGT1A*-Transkripte werden von fünf Exons transkribiert und durch sogenanntes Exon-Sharing gebildet (Abb.1).

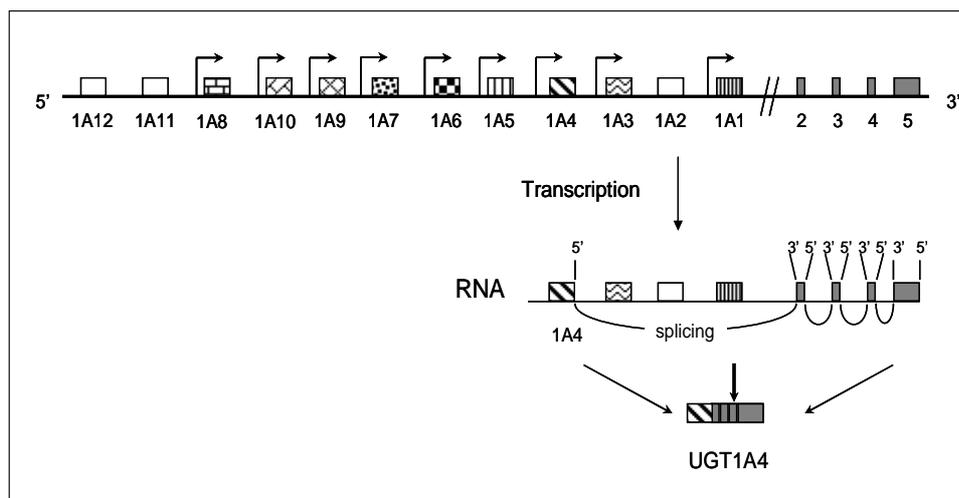


Abb.1: Genetische Organisation des humanen *UGT1A*-Lokus und beispielhafte Transkription des *UGT1A4*-Gens.

Für jedes *UGT1A*-Gen ist das Exon 1, das für die 287 ± 2 Aminosäuren (AS) lange aminoterminalen Substratbindedomäne des Enzyms kodiert, einzigartig und damit spezifisch für jede *UGT1A*-Isoform (19). Die Exons 2 bis 5 kodieren für den 245 AS langen C-terminalen Teil, der bei jedem *UGT1A*-Protein identisch ist und eine Bindedomäne für UDP-Glukuronsäure im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums, eine hydrophobe Transmembrandomäne (17 AS) und eine kleine cytoplasmatische Domäne (20 AS) beinhaltet (20-22). Die Verwendung einer Vielzahl individueller erster Exons erlaubt die Glukuronidierung eines breiten Spektrums von Substraten,

während der konstante Teil aus den Exons 2-5 eine stabile Glukuronidierungsfunktion gewährleistet.

Kürzlich wurde ein neuer alternativer Splicing-Mechanismus entdeckt, der ein neu entdecktes Exon 5b in der konstanten Exon 2-5 Region mit einbezieht und zur Herstellung von verschiedenen mRNA-Transkripten eines einzelnen *UGT1A*-Gens und zur Generierung vorher nicht bekannter UGT1A-Proteine führt (Abb.2).

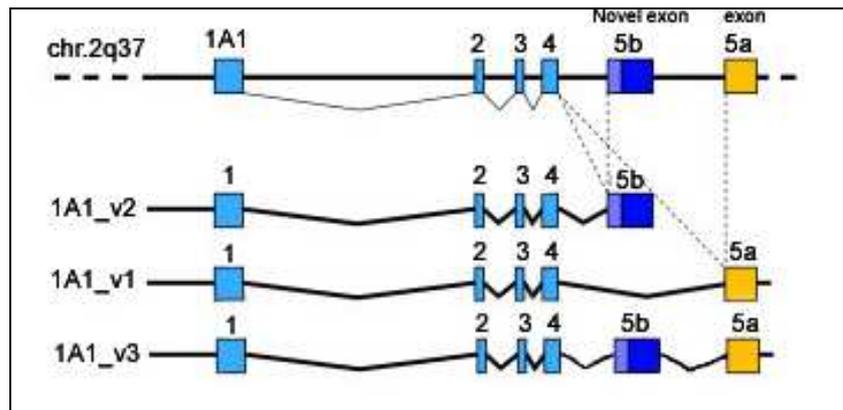


Abb.2: Herstellung der drei verschiedenen Transkriptvarianten v1, v2 und v3 durch alternatives Splicing. Verändert nach *Lévesque et al., Hepatology 2007*.

Es wurden drei verschiedene Transkripte pro *UGT1A*-Gen in humanen Geweben identifiziert: v1, v2 und v3, wobei es sich bei v1 um das konventionelle, schon vorher bekannte Transkript handelt. Im Beispiel von *UGT1A1* enthält das Transkript UGT1A1_v1 das Exon 5a (alt), UGT1A1_v2 das Exon 5b (neu) und UGT1A1_v3 beide Exons (5a+5b) (Abb.2). Durch den alternativen Splicing-Mechanismus entstehen zwei UGT1A1-Protein-Varianten: die klassische Isoform (UGT1A1_v1) und die neue Isoform 2 (UGT1A1_v2), dessen Expressionslevel signifikant zwischen verschiedenen Individuen und Geweben variiert. Die Proteine, die vom v3-Transkript translatiert werden, sind identisch zu denen, die vom v2-Transkript enkodiert werden, weil sie identische Open Reading Frames (ORF) haben. Die Varianten v1 und v2 wurden in fast allen Organen nachgewiesen, in denen auch das klassische v1-Transkript vorhanden ist (Leber, Niere, Kolon, Ösophagus, Dünndarm, Lunge). Ein Isoform-spezifisches Expressionsmuster der verschiedenen Varianten wurde für menschliches Gewebe (Leber, Niere, Kolon, Ösophagus, Dünndarm) bereits gezeigt (Abb.3).

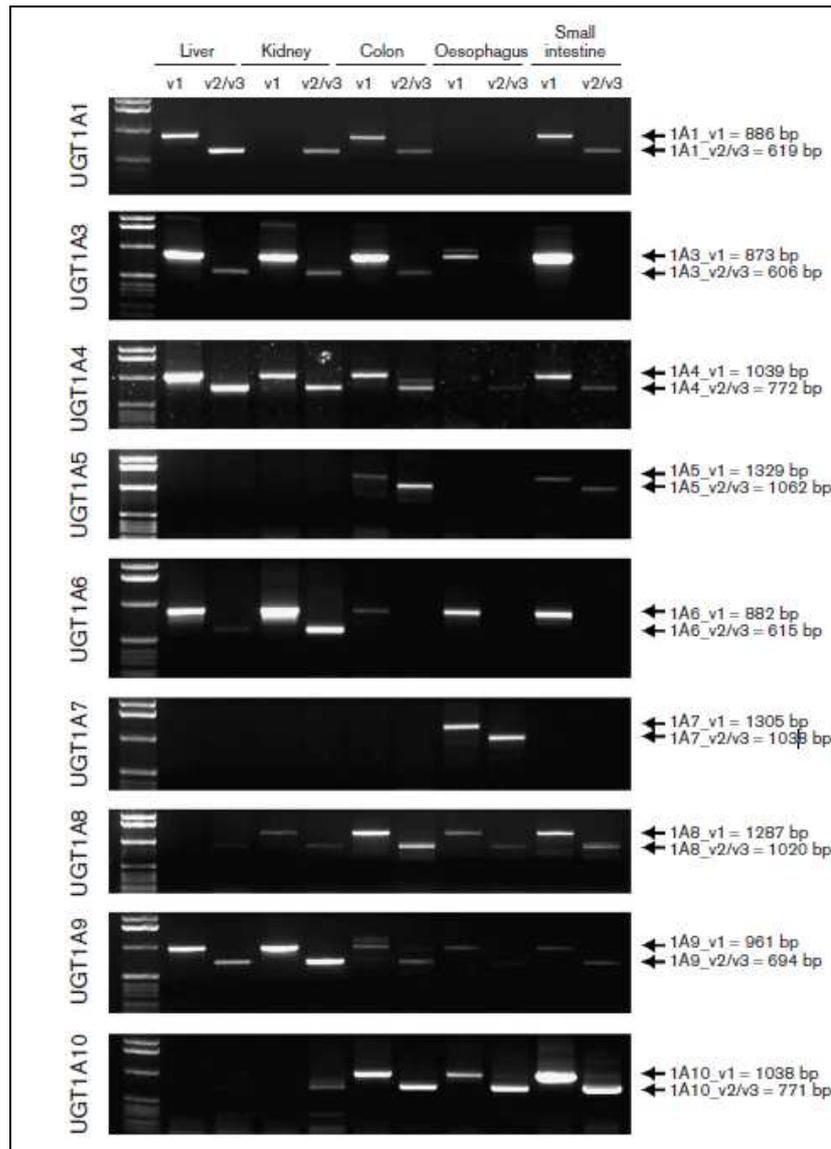


Abb.3: Verteilung der spezifischen UGT1A-Transkriptvarianten in humaner Leber, Niere, Kolon, Ösophagus und Dünndarm. *Girard et al., Pharmacogenet Genomics 2007.*

Die UGT1A_v2-Proteine sind, eventuell aufgrund des Fehlens von Exon 5a, enzymatisch inaktiv. Trotz der Abwesenheit der Glukuronsäure-Transferase-Aktivität wirken die v2-Varianten *in vitro* als negative Modulatoren der Konjugationsaktivität der UGT1A_v1-Proteine, zumindest im Fall der v2-Varianten von *UGT1A1*, *UGT1A7*, *UGT1A8* und *UGT1A10*. Dies stellt einen neuen nicht direkt genetisch durch kodierende Polymorphismen determinierten Mechanismus der Modulation der Glukuronidierungsaktivität dar (23,24), der unabhängig von der Transkripthöhe ist.

Substratspezifität, Expression und Regulation

Einzelne UGTs haben aufgrund der individuellen Substratbindedomänen, die von dem isoformspezifischen Exon 1 kodiert werden, spezifische Substratpräferenzen, wobei es aber generell eine ausgeprägte Substratüberlappung gibt. So existieren Verbindungen (z.B. 4-Methylumbelliferone), die von mehreren UGT1A-Isoformen glukuronidiert werden können (25), aber auch Substrate, die ausschließlich von einer einzigen UGT1A-Isoform katalysiert werden, wie z.B. das Bilirubin von UGT1A1 (26).

UGTs werden gewebespezifisch exprimiert, d.h. in jedem Gewebe ist ein spezifisches Expressionsmuster von UGT1A-Isoformen zu finden. Lange wurde angenommen, die Leber sei das zentrale Stoffwechselorgan und beinhalte den Hauptanteil der Glukuronidierung. Heute weiß man, dass eine Vielfalt von verschiedenen UGT1A-Proteinen auch im Gastrointestinaltrakt exprimiert werden, dessen große metabolisch sehr aktive Mukosa den ersten Kontakt zu Xenobiotika herstellt. Unter den UGT1A-Isoformen werden UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9 unter anderem in der Leber exprimiert, während UGT1A7, UGT1A8 und UGT1A10 ausschließlich im extrahepatischen Gastrointestinaltrakt exprimiert werden (14,27-29). Auch wenn die Gene des *UGT1A7-10* Clusters eine Promotorsequenzhomologie von mehr als 75% aufweisen, wird *UGT1A9* in der Leber, alle anderen Gene des Clusters jedoch ausschließlich extrahepatisch exprimiert. Der Grund für das gewebespezifische Expressionsmuster ist weitgehend unbekannt. Vermutlich wird jedes *UGT1A*-Gen abhängig vom Gewebetyp reguliert, indem verschiedene Transkriptionsfaktoren an den Promotor binden, der stromaufwärts eines jeden Exons 1 liegt und für jedes *UGT1A*-Gen spezifisch ist, und so die Transkription positiv oder negativ beeinflussen. Für die Promotoren der *UGT1A3*- und *UGT1A4*-Gene wurden kürzlich verschiedene Transkriptionsfaktoren wie der Hepatocyte Nuclear Factor 1 alpha (HNF1 α) oder der Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) und dessen Bindungselemente identifiziert, durch die die Transkription dieser Gene um ein Vielfaches heraufreguliert wird (30-32). Der *UGT1A1*-Promotor wird ebenso durch HNF1 α und AhR, aber auch durch den Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (Nrf2) reguliert (33-35). Innerhalb des *UGT1A7-10* Clusters ist wenig über die transkriptionelle Regulation bekannt. *UGT1A8*, *UGT1A9* und *UGT1A10* werden alle durch HNF1 α aktiviert. Jedoch werden im Gegensatz zu der hepatischen *UGT1A9* ausschließlich die extrahepatischen *UGT1A8* und *UGT1A10* durch das Caudal-related Homeodomain Protein2 (Cdx2) induziert (36), was möglicherweise ein Faktor ist, der zur Gewebespezifität beiträgt.

Da Enzyme der UGT1A-Familie eine hohe Glukuronidierungsaktivität gegenüber verschiedenen xenobiotischen Substanzen haben und gewebespezifisch in Organen mit primärem Kontakt zu aufgenommenen Substanzen aus der Umwelt exprimiert werden (Gastrointestinaltrakt, Lunge), spielen sie eine bedeutende Rolle in der Karzinogen-Detoxifizierung und im Pharmaka-Metabolismus. Die Erforschung von modifizierenden Faktoren wie Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) oder von Veränderungen der Transkriptionsrate durch inhibierende oder induzierende Substanzen ist daher von hoher klinischer und pharmakologischer Relevanz.

1.4 Expression, Polymorphismen und Bedeutung der *UGT1A1*-, *UGT1A7*-, *UGT1A8*-, *UGT1A9*- und *UGT1A10*-Gene

UGT1A1

Hämoglobin wird im Menschen zu Bilirubin abgebaut, welches nicht wasserlöslich ist und unmodifiziert nicht ausgeschieden werden kann. In der Leber wird Bilirubin durch UGT1A1 mit Glukuronsäure konjugiert und damit hydrophil. UGT1A1, das in Leber, Dünn- und Dickdarm sowie in den Gallengängen exprimiert wird, ist die einzige biologisch relevante UGT1A-Isoform, die Bilirubin konjugieren kann (37). Es gibt darüber hinaus im Menschen keinen anderen Weg für eine effektive Detoxifizierung und Eliminierung von Bilirubin. Abgesehen vom Bilirubin katalysiert UGT1A1 die Glukuronidierung einiger anderer endogener und exogener Substrate wie 2-Hydroxyöstron, Estradiol sowie eine Anzahl von Medikamenten wie Ethinylestradiol, Gemfibrozil, Metabolite von Irinotecan, Simvastatin und Buprenorphin (38). Außerdem werden mutagene Xenobiotika wie N-Hydroxy-2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazol[4,5- β]Pyridin und Benzo(α)pyren (BaP) der Glukuronidierung und Detoxifizierung von UGT1A1 unterzogen (39). Unter Berücksichtigung der Glukuronidierungsleistung von UGT1A1 können Veränderungen ihrer Aktivität zur Modulation des Pharmaka-Metabolismus oder der Disposition gegenüber Umweltkarzinogen-assoziierten Krankheiten führen. Bis heute wurden 113 verschiedene genetische Varianten des *UGT1A1*-Gens identifiziert, die zu einem unterschiedlichen Grad die UGT1A1-Enzymaktivität verändern. Wird die UGT1A1-Aktivität durch Polymorphismen soweit herunterreguliert, dass Bilirubin nur noch minimal oder gar nicht konjugiert werden kann, kommt es zur Ausbildung des Crigler-

Najjar-Syndroms Typ I, das zu einer Bilirubin-Akkumulation im Zentralnervensystem führt und ohne Behandlung letal ist (40,41). Einen milderen Phänotyp repräsentiert das Crigler-Najjar-Syndrom Typ II mit einer niedrigen Glukuronidierungsaktivität von UGT1A1 (42,43). Die am meisten erforschte *UGT1A1*-Variante ist UGT1A1*28, die eine TA-Insertion in der TATA-Box (A(TA)₆TAA>A(TA)₇TAA) von *UGT1A1* aufweist. Dadurch wird die *UGT1A1*-Transkription um 70% reduziert. Die homozygote Variante UGT1A1*28 (+/+) ist in 11-16% der europäischen Bevölkerung zu finden und mit dem Gilbert-Meulengracht-Syndrom assoziiert, das sich durch eine leichte unkonjugierte Hyperbilirubinämie (Gelbsucht) nach Schlafentzug oder Fastenperioden auszeichnet (44,45). Bei manchen Neugeborenen, die die UGT1A1*28-Variante tragen, wird ein Ikterus neonatorum prolongatus diagnostiziert, der mit einer verlängerten Gelbsucht aufgrund einer ineffektiven Bilirubin-Glukuronidierung einhergeht (46).

Für die UGT1A1*6-Variante wurde eine Assoziation mit einem erhöhten Risiko für ein kolorektales Karzinom identifiziert (mit einer Odds Ratio (OR) von 2,03) (47). In den letzten Jahren hat sich jedoch herausgestellt, dass meist nicht nur ein einziger Polymorphismus, sondern verschiedene Haplotypen (Kombination aus verschiedenen Polymorphismen) relevant zu sein scheinen. Eine Kombination der UGT1A1*28-Variante und verschiedenen *UGT1A7*-Varianten (UGT1A7*3 und UGT1A7*12) ist z.B. mit einer erhöhten Toxizität des Zytostatikums Irinotecan assoziiert (48). Ein ähnlicher Haplotyp mit weiteren UGT1A-Varianten wurde auch mit einer schweren unkonjugierten Hyperbilirubinämie unter Behandlung mit Atazanavir und Indinavir zur Therapie von HIV-Infektionen verbunden (16,49).

UGT1A7

UGT1A7 wird ausschließlich extrahepatisch in oropharyngealem Gewebe, in Ösophagus, Magen, Lunge und Pankreas exprimiert und katalysiert die Glukuronidierung von Phenolen, Anthraquinonen, Flavonen, Naphthol-Strukturen und Cumarin-Derivaten (14,50,51). Aufgrund seiner Expression im oberen Gastrointestinaltrakt und in der Lunge kommt UGT1A7 eine Rolle der Gewebeprotektion gegenüber aus der Umwelt aufgenommenen Karzinogenen zu. Weiterhin übernimmt UGT1A7 den größten Teil der Glukuronidierung des Irinotecan-Metaboliten SN-38 (52,53). Von großer Bedeutung ist jedoch, dass UGT1A7 eine hohe Glukuronidierungsaktivität gegenüber Mutagenen, wie den im Tabakrauch enthaltenen BaP und heterozyklischen Aminen wie

2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazol[4,5- β]Pyridin (PhIP), zeigt, die als humane Karzinogene für eine Reihe von Krebsarten identifiziert worden sind (54-58). Studien belegen, dass die Detoxifizierung von Mutagenen und Prokarzinogenen durch Glukuronidierung eine wichtige Rolle in der chemischen Karzinogenese spielt (59-64). Die *UGT1A7*-Variante *UGT1A7*3*, die drei AS-Austausche in Exon 1 (N129K/R131K und W208R) und einen Promotorpolymorphismus (-57T>G) aufweist, wurde mit einem erhöhten Risiko für das hepatozelluläre Karzinom (HCC) assoziiert (65).

UGT1A8

Das humane *UGT1A8*-Gen wird exklusiv extrahepatisch in Ösophagus, Dünndarm und Kolon exprimiert. Die Substrate von *UGT1A8* schließen unter anderem Flavonoide, Cumarine, Anthraquinone, Östrogene und das Karzinogen 4-Aminobiphenyl ein (14,66). Bis heute wurden nur zwei Polymorphismen im kodierenden Bereich identifiziert. Die Variante *UGT1A8*2* (allelische Frequenz von 15-59%) zeigt im Vergleich zur Wildtyp-Form eine nahezu gleiche Aktivität gegenüber *UGT1A8*-spezifischen Substraten (67). Dahingegen weist die Variante *UGT1A8*3* eine verminderte Aktivität auf, kommt aber in der kaukasischen Bevölkerung nur sehr selten vor (1-2%). Eine Assoziation dieser Variante mit dem kolorektalen Karzinom (68), dem HCC (69) oder der chronischen Pankreatitis (70) konnte in diversen Studien nicht nachgewiesen werden.

UGT1A9

UGT1A9 wird auf hohem Niveau in den Nieren und als einzige Isoform des *UGT1A7-10* Clusters in der Leber exprimiert. Zu ihren Substraten gehören Flavopiridol, Mycophenolat (71,72), Propofol, Acetaminophen, nonsteroidale antiinflammatorische Medikamente, Antikrebs-Medikamente (73), Catechol-Östrogene (74), Fettsäuren und die mutagenen Arylamine PhIP und *N*-OH-PhIP (75). Es wurden bereits zahlreiche Promotorpolymorphismen und fünf SNPs innerhalb der Exon-Sequenz identifiziert, die allerdings nur eine geringe Frequenz aufweisen und nur teilweise durch eine verminderte Enzymaktivität gekennzeichnet sind (76,77). Der Intron-Polymorphismus I399C>T führt zu einer erhöhten Proteinexpression und einer vermehrten Glukuronidierungsaktivität gegenüber dem Irinotecan Metaboliten SN-38 (73) sowie dem Immunsuppressivum Mycophenolsäure (78).

UGT1A10

Das humane *UGT1A10*-Gen wird in Ösophagus, Magen, Dünndarm, Kolon, Zunge und Gallengängen exprimiert (13,25,28,29,79,80). UGT1A10 glukuronidiert eine Reihe von karzinogenen Substanzen wie 2-Acetylaminofluoren-Derivate (13), BaP (14,28,50) und PhIP (81). Weiterhin werden von UGT1A10 Flavone wie Luteolin, Quercetin (82), und Eupatilin (83) sowie Medikamente wie Mycophenolat (84), Indolocarbazol-Analoga (85), Raloxifen (86,87), Troglitazon (88), Dobutamin (89) und Propranolol (90) konjugiert. Interessanterweise ist UGT1A10 die Hauptisoform für die Glukuronidierung von nativen Östrogenen und ihren hydroxylierten Metaboliten (14,91). In Plattenepithelkarzinomen (28), gastrischen Adenokarzinomen (27) und in Mammakarzinomen (92) ist die Expression von *UGT1A10* herunterreguliert. Aufgrund der wichtigen Rolle von UGT1A10 in der Detoxifizierung von Mutagenen können Veränderungen ihrer katalytischen Aktivität eine große Bedeutung in der Mutagen-abhängigen Karzinogenese haben. Bis heute wurden neun SNPs, die alle mit einer geringen Frequenz vorkommen, im Exon 1 von *UGT1A10* identifiziert. Drei davon sind „silent“, die übrigen sechs SNPs führen zu AS-Austauschen (93,94). Die UGT1A10*7-Variante (I211T in Exon 1, allelische Frequenz 1%) zeigt keine Aktivität gegenüber den Hauptsubstraten der UGT1A10-Wildtyp-Isoform (95). Die Glukuronidierungsaktivität von UGT1A10*2 (Q139K) gegenüber BaP und PhIP ist stark herabgesetzt (81,96), wurde aber auch in einer Case-Control-Studie mit einem verminderten Risiko von oropharyngealen Karzinomen in Afrikanern assoziiert (93). Erstaunlicherweise wurden bis heute keine Polymorphismen in der Promotorregion von *UGT1A10* identifiziert.

1.5 Der Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (Nrf2) als Sensor von oxidativem Stress und der durch Xenobiotika aktivierte Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR)

Die verantwortlichen Signaltransduktionswege, die unter Bedingungen von oxidativem Stress eingeschaltet und zu einer Heraufregulierung von geeigneten Abwehr-Genen führen, sind in Eukaryoten weitgehend ungeklärt. Der Transkriptionsfaktor Nrf2 scheint jedoch eine Schlüsselrolle in der Regulation von Abwehr-Genen im durch ROS induzierten oxidativen Stress zu spielen (8,97). Nrf2 ist ein Mitglied der Cap'n'Collar-

Familie von Basic Leucin Zipper (bZIP)-Proteinen und bindet an sogenannte Antioxidant Response Elements (ARE) im Promotor seiner Zielgene (98). Unter normalen Bedingungen ist Nrf2 an seinen Inhibitor, dem mit dem Zytoskelett assoziierten Keap1, gebunden, der Nrf2 durch die Förderung seines proteosomalen Abbaus reprimiert (99). Durch eine Stimulierung durch Antioxidantien wie *tert*-Butylhydroquinon (*t*BHQ) wird Nrf2 von Keap1 freigesetzt, transloziert in den Zellkern und kann mit anderen Transkriptionsfaktoren wie Jun und small Maf Heterodimere bilden (100-102).

Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass es eine Interaktion („Crosstalk“) zwischen dem Nrf2-Pathway und dem AhR-Pathway gibt. AhR ist ein Basic Helix Loop Helix Transkriptionsfaktor, der vor der Ligandenbindung durch direkte Interaktion mit dem Heat Shock Protein 90 (HSP90), dem X-associated Protein 2 (XAP2) und dem HSP90 Co-Chaperon p23 im Cytoplasma stabilisiert wird (103). Nach Bindung eines Liganden, der z.B. zur Gruppe der aromatischen Kohlenwasserstoffe gehört (z.B. 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-Dioxin (TCDD), BaP, Phytochemikalien oder Sterole) transloziert der AhR-Ligand-Komplex in den Zellkern und dimerisiert dort mit dem Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (Arnt) (104). Das AhR-Arnt-Dimer bindet dann an sogenannte Xenobiotic Response Elements (XRE, oder DRE – Drug Responsive Elements), die in vielen Promotoren von Pharmaka-metabolisierenden Enzymen lokalisiert sind und diese transkriptionell regulieren (z.B. CYP).

Einige Studien haben den Crosstalk zwischen Nrf2 und AhR untersucht. Eine Mutagenese des ARE-Bindungselementes im Promotor des humanen *UGT1A6*-Gens führte, wie erwartet, zu einer reduzierten Induzierbarkeit durch *t*BHQ, aber erstaunlicherweise gleichzeitig zu einem Verlust der TCDD vermittelten Induktion, obwohl der durch TCDD aktivierte AhR eigentlich nicht an ARE- sondern nur an XRE-Bindungsstellen binden sollte (105). In einer weiteren aussagekräftigen Studie wurde in Wildtyp- und in Nrf2-Knockout-Mäusen die Abhängigkeit der TCDD-Induzierbarkeit verschiedener Pharmaka-katalysierender Enzyme von der Anwesenheit von Nrf2 untersucht. Es wurde gezeigt, dass die TCDD-Induktion von *Ugt1a5*, *1a6* und *1a9* abhängig von der Anwesenheit von Nrf2 war, während die TCDD-Induktion von *Ugt1a1* unabhängig von Nrf2 war (106). Um dieses Phänomen zu erklären, gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Miao *et al.* demonstrierte, dass die *Nrf2*-Gentranskription direkt durch AhR via XRE-Bindestellen im *Nrf2*-Promotor moduliert wird (107). Ein zweiter möglicher Mechanismus wäre eine direkte Interaktion zwischen

den AhR- und Nrf2- Proteinen, allerdings wurde bis heute noch kein Beweis dafür erbracht, dass die beiden Transkriptionsfaktoren physikalisch miteinander interagieren können. Eine dritte Möglichkeit wäre eine Interaktion zwischen Nrf2 und AhR-assoziierten Proteinen oder eine Interaktion zwischen AhR und Nrf2-assoziierten Proteinen.

Innerhalb des *UGT1A*-Lokus wurde für die *UGT1A1*-, *UGT1A3*- und *UGT1A4*-Gene bereits eine Induzierbarkeit durch TCDD (AhR) gezeigt und die vermittelnden XRE-Bindestellen identifiziert (31,32,34). Im *UGT1A1*-Promotor wurde auch eine funktionelle ARE-Bindestelle identifiziert (35). Eine gegenseitige Abhängigkeit der Transkriptionsfaktoren AhR und Nrf2 wurde dort allerdings nicht beschrieben.

1.6 Kaffee und seine antioxidative Wirkung

Kaffee gehört zu den am meisten konsumierten Getränken weltweit. Der Gesamt-Kaffeekonsum wird auf sieben Milliarden Kilogramm Kaffeebohnen jährlich geschätzt. Obwohl der Kaffee auch aufgrund seines Aromas und Geschmacks geschätzt wird, ist wohl die pharmakologische Wirkung des in ihm gelösten Koffeins ein entscheidender Faktor für das Konsumverhalten und seine weltweite Popularität. Tatsächlich ist Kaffee eine komplexe chemische Mischung, die mehr als tausend verschiedene Verbindungen enthält. Dazu gehören z.B. Carbohydrate, Lipide, Stickstoffverbindungen, Vitamine, Mineralien, Alkaloide und phenolische Verbindungen (108,109).

Der Kaffeekonsum wurde in vielen Studien im Zusammenhang mit Krankheitsdisposition studiert. Dabei wurde festgestellt, dass Kaffeetrinker ein vermindertes Risiko für Typ II Diabetes mellitus (110), für den M. Parkinson (111) und für kolorektale Karzinome (112) haben. Weiterhin zeigen epidemiologische und interventionelle Studien, dass Kaffeekonsum mit einem verminderten Risiko an HCC zu erkranken assoziiert ist. In einer Meta-Analyse wurden zehn publizierte Studien mit 2660 HCC-Patienten reanalysiert. Es ergab sich insgesamt ein relatives Risiko von 0,59 (95% CI 0.49-0.72). Demnach haben Kaffeetrinker ein um 41% verringertes Risiko an HCC zu erkranken. Für niedrigen bis mittleren (1-3 Tassen pro Tag) Kaffeekonsum lag das relative Risiko bei 0,70 (95% CI 0.57-0.85) und für starke Kaffeetrinker (>3 Tassen pro Tag) bei 0,45 (95% CI 0.38-0.53) (113). Zudem wurde Kaffeekonsum auch in Verbindung mit einem verringerten Risiko von Zirrhose, ein Hauptrisikofaktor im

Prozess der Leberkarzinogenese, gebracht (114-116). Ferner zeigte eine amerikanische Populationsstudie, dass bei Kaffeetrinkern die auf Leberentzündung hinweisenden Aminotransferasen im Serum signifikant niedriger waren (117). Die Mechanismen, die für den antikarzinogenen und antiinflammatorischen Effekt des Kaffees verantwortlich sind konnten bislang nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Es gibt dazu verschiedene Hypothesen: Der Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) ist einer der Hauptregulatoren im Prozess der Fibrogenese der Leber. Es wurde gezeigt, dass Koffein durch eine Erhöhung der intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Konzentration die TGF- β 1 induzierte Expression vom Connective Tissue Growth Factor (CTGF), der eine profibrotische Wirkung hat, stark herunterreguliert. Dies wird als potentielle Ursache für die antifibrotische Wirkung des Kaffees angesehen (118). Eine andere Theorie basiert darauf, dass Kaffee als Blockierungsmittel angesehen wird, das frühe mutagene Ereignisse durch die Induktion der Karzinogen-Detoxifizierung verhindert. Die effektivste Strategie, um Zellen oder Gewebe vor toxischen und neoplastischen Effekten vieler Karzinogene zu schützen, ist die Induktion von detoxifizierenden und antioxidativen Phase II Enzymen. Welche genauen Bestandteile im Kaffee jedoch für die Induktion verantwortlich sind, ist bislang ungeklärt. Es gibt jedoch einige Substanzen im Kaffee, deren antioxidative Wirkung bereits aufgeklärt und diese zum Teil mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 in Verbindung gebracht wurde (119).

Wichtige Kaffeeinhaltsstoffe und ihre Wirkung

Koffein (1, 3, 7-Trimethylxanthin) ist ein Purin-Alkaloid, das natürlicherweise in Kaffeebohnen enthalten ist. Bei einem normalen Koffeinkonsum fungiert Koffein hauptsächlich als Antagonist von A₁- und A₂-Subtypen des Adenosinrezeptors (120). Adenosin ist ein endogener Neuromodulator mit meist inhibitorischer Wirkung und der Adenosin-Antagonismus durch Koffein hat daher generell eine stimulierende Wirkung. Es kommt unter anderem zu einer Stimulierung des zentralen Nervensystems, akuter Erhöhung des Blutdrucks, einer erhöhten Metabolisierungsrate und Harnausscheidung (121). Koffein wird schnell und fast vollständig im Magen und Dünndarm resorbiert und in alle Gewebe inklusiv Gehirn verteilt. Der Koffein-Metabolismus findet primär in der Leber statt, wo die Cytochrom P450 Isoform CYP1A2 die 3-Demethylierung von Koffein katalysiert, wodurch 1, 7-Dimethylxanthin (Paraxanthin) entsteht (122,123). Koffein wird zu 70% zu Paraxanthin abgebaut. Weitere Produkte des Koffein-Abbaus

sind Theobromin, das durch 1-N-Demethylierung entsteht und Theophyllin, das durch 7-N-Demethylierung gebildet wird. Zu Theobromin und Theophyllin wird Koffein jeweils zu ca. 9% abgebaut. Weiterhin wird Koffein geringfügig zu 1, 3, 7-Trimethyl-Harnsäure hydroxiliert (124). Der Koffeingehalt eines Kaffees kann stark variieren. Eine Standardtasse Kaffee (150 ml) enthält allgemein um die 100 mg Koffein.

Weiterhin enthält Kaffee Chlorogensäure (5-O-Caffeoylquinic Acid). Chlorogensäuren sind eine Familie von Estern, die zu den Phenolsäuren gehören. Kaffee ist die reichste Nahrungsquelle für Chlorogensäure und Kaffeesäure. Eine Tasse Kaffee enthält 70-350 mg Chlorogensäure und 35-175 mg Kaffeesäure. 33% der Chlorogensäure und 95% der Kaffeesäure werden intestinal absorbiert. Die restliche Chlorogensäure erreicht das Kolon, wo sie durch die Mikroflora zu Kaffeesäure und Chinasäure hydrolysiert wird. Die bakteriellen Metabolite werden dann im Kolon resorbiert. *In vitro* wurde bereits gezeigt, dass Chlorogensäure und Kaffeesäure eine antioxidative Wirkung zeigen (125). In weiteren Experimenten konnte auch nachgewiesen werden, dass der bei oxidativem Stress aktivierte Transkriptionsfaktor Nrf2 durch Chlorogensäure aktiviert wurde und dadurch Phase II Enzyme heraufreguliert wurden (126,127).

Skandinavischer Kaffee, Türkischer Kaffee und French Press Kaffee enthalten relativ hohe Konzentrationen der Kaffeelipide Cafestol und Kahweol (C+K) (6-12 mg/ Tasse), während sie in Filterkaffee und Instant Kaffee kaum enthalten sind (0,2-0,6 mg/ Tasse). Kaffeekonsum wurde mit erhöhten Cholesterolkonzentrationen assoziiert. Allerdings gab es in mehreren Studien widersprüchliche Ergebnisse. Die positive Assoziation war in Skandinavien stimmiger als in anderen Ländern Europas oder in den USA, in denen hauptsächlich Filterkaffee konsumiert wird. 70% des C+K werden intestinal absorbiert. In Zellkultur und in Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass eine C+K-Behandlung zu einer verminderten Genotoxizität einiger Karzinogenen einschließlich 7,12-Dimethylbenz[α]anthracen (DMBA), Aflatoxin B₁, BaP und PhIP führt. Diese chemoprotektive Wirkung scheint mehrere Mechanismen zu vereinen: eine Induktion von konjugierenden Enzymen (z.B. GST), eine erhöhte Expression von Proteinen, die in der zellulären antioxidativen Abwehr involviert sind (z.B. GCS und Hämoxigenase 1) und eine Inhibierung der Expression/Aktivität von Cytochrom P450 Enzymen. Im Mausmodell wurde bereits gezeigt, dass die C+K-abhängige Induktion von verschiedenen Phase II Enzymen durch Nrf2 vermittelt wird (128).

Der Röstungsprozess von Kaffeebohnen führt zur Bildung des charakteristischen Aromas und zu den dunkel gefärbten Röststoffen. Diese Aromastoffe werden hauptsächlich durch eine sogenannte Maillard-Reaktion (108) gebildet, die zwischen Carbohydraten und Proteinen stattfindet. Diese dunkel gefärbten Verbindungen, die als Melanoidine bezeichnet werden, machen bis zu 25% der Trockenmasse im gebrühten Kaffee aus. Auch für Melanoidine wurde eine antioxidative Wirkung beschrieben (129,130).

Letztlich beinhaltet der Kaffee einige Mikronährstoffe wie Magnesium, Kalium, Niacin und Vitamin E. Das in der grünen Kaffeebohne enthaltene Trigenollin wird während der Röstung zu Nikotinsäure demethyliert. Zu den Mikronährstoffen gibt es bislang keine Studien, die eine Assoziation mit dem chemopräventiven Effekt des Kaffees untersuchen (109).

1.7 Tee und Kakao sowie ihre chemopräventive Wirkung

Grüner Tee ist eines der bekanntesten und am meisten konsumierten Getränke weltweit und repräsentiert eine vielversprechende Quelle für chemopräventive Phytochemikalien. Viele Studien gehen von einer protektiven Rolle des grünen Tees gegenüber verschiedenen Formen von Krebs aus. So wurde der Teekonsum mit einem verminderten Risiko für Magen- (131), Pankreas- und Kolorektalkrebs (132) und einem verminderten Wiederauftreten von Brustkrebs (133) assoziiert. Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG) macht einen Großteil der Polyphenole im grünen Tee aus. Die chemopräventiven und antioxidativen Eigenschaften des EGCGs wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht. EGCG verhindert z.B. die durch tabakspezifisches Nitrosamin (134) oder UV-Strahlung (135) verursachte oxidative DNA-Schädigung und Zytotoxizität in Mäusen. Vermutlich aktiviert EGCG den Transkriptionsfaktor Nrf2, indem es einige Mitogen-aktivierte Kinasen (MAPK) aktiviert, die dann wiederum Nrf2 phosphorylieren und damit eine Befreiung vom Inhibitor Keap1 bewirken (136). Nrf2 induziert dann seinerseits die Expression von vielen antioxidativen Phase II Enzymen. Im Zellkulturmodell wurde weiterhin gezeigt, dass EGCG die Transkription von *UGT1A1* via Nrf2 steigert (137). Schwarzer Tee enthält auch EGCG, allerdings in viel geringerer Konzentration. In Mäusen konnte zwar gezeigt werden, dass schwarzer Tee einen inhibitorischen Effekt auf die

Lungentumorgenese (138) hat, dieser konnte aber nicht in Brust- oder Prostata-Krebs-Modellen nachgewiesen werden (139).

Kakao wird seit dem 16. Jahrhundert in Europa konsumiert und ist eine reiche Quelle an Ballaststoffen (26-40%), Proteinen (15-20%), Carbohydraten (ca. 15%), Lipiden (10-12%). Außerdem enthält Kakao Mineralien (Calcium, Magnesium, Kalium) und Vitamine (A, E, B, Folsäure) (140). Das Interesse an Kakao gilt vor allem seinen antioxidativen Polyphenolen, vor allem den Flavonoiden. Eine Tasse Kakao enthält mehr phenolische Antioxidantien (hauptsächlich Epicatechin und Catechin) als Tee (141). Weiterhin enthält Kakaopuder ca. 1,9% Theobromin und 0,21% Koffein. Die im Kakao enthaltenen Flavonoide agieren direkt als Neutralisator von freien Radikalen (z.B. Fe^{2+} und Cu^+), die ROS-Level erhöhen können. Weiterhin inhibieren Flavonoide die unter anderem für die ROS-Entstehung verantwortlichen Phase I Enzyme und induzieren den Transkriptionsfaktor Nrf2 (140,142,143), der wiederum die Expression verschiedener Phase II Enzyme heraufregulieren kann.

1.8 Zielsetzung

UGTs spielen als detoxifizierende Phase II Enzyme eine wichtige Rolle in der Biotransformation und damit in der Beseitigung von karzinogenen Substanzen. Polymorphismen in den Exon- und Promotorbereichen einzelner UGT1A-Isoformen kommen häufig vor und sind mit vermehrten Nebenwirkungen bei der Therapie mit bestimmten Medikamenten und einer Prädisposition für Krebs assoziiert. Die Regulation der konstitutionellen *UGT1A*-Expression, die zu dem gewebespezifischen Expressionsmuster verschiedener Isoformen führt, ist nur unzureichend geklärt. Obwohl bekannt ist, dass man die Expression einiger *UGT1A*-Isoformen durch Induktoren wie TCDD oder Phenobarbital heraufregulieren kann, ist die Regulation der *UGT1A8*-, *UGT1A9*- und *UGT1A10*-Gene kaum untersucht. Weiterhin ist fraglich, welchen Einfluss täglich konsumierte Substanzen wie Kaffee, Tee oder Kakao auf die *UGT1A*-Expression haben und ob man durch diese diätetisch unbedenklichen Substanzen die *UGT1A*-Expression auf eine „nicht-pharmakotherapeutische“ Art modulieren kann. Neben der Regulation von UGTs ist aber auch die Generierung verschiedener *UGT1A*-Transkript-Varianten Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Ungeklärt ist dabei unter anderem, welchen Einfluss SNPs auf die Expression von verschiedenen Transkript-Varianten haben.

Daraus ergaben sich folgende Ziele für diese Arbeit:

1. Da bis heute keine Polymorphismen im Promotorbereich des *UGT1A10*-Gens veröffentlicht wurden, sollte der Promotor auf potentielle SNPs untersucht und deren Einfluss auf die *UGT1A10*-Expression charakterisiert werden.
2. Charakterisierung der transkriptionellen Regulation von *UGT1A10* durch die Transkriptionsfaktoren AhR und Nrf2 im Vergleich zu den Genen *UGT1A8* und *UGT1A9*. Obwohl die drei Gene eine sehr hohe Sequenzhomologie aufweisen, wird *UGT1A9* als einzige der drei Isoformen in der Leber exprimiert. Daher sollten eventuelle Unterschiede in der Regulation der *UGT1A8*- und *UGT1A10*-Gene versus *UGT1A9* als potentielle Ursache für das gewebespezifische Expressionsmuster aufgeklärt werden.
3. Die Mechanismen die dazu führen, dass Kaffee-/Teetrinker ein vermindertes Risiko für bestimmte Krebsarten haben, sind bis heute ungeklärt. Daher sollte der Einfluss von alltäglich in der Bevölkerung konsumierten Getränken (Kaffee, Tee, Kakao) auf die *UGT1A*-Expression im Zellkultursystem und im humanisierten transgenen *UGT1A*-Mausmodell untersucht werden. Weiterhin sollte der Einfluss genetischer Varianten der *UGT1A1*- und *UGT1A7*-Gene auf eine potentielle Induktion durch Kaffee analysiert werden.
4. Charakterisierung der durch das neu entdeckte alternative Splicing (siehe 1.3) generierten verschiedenen *UGT1A*-Transkriptvarianten (v1/v2/v3) im humanisierten transgenen *UGT1A*-Mausmodell. Dabei sollte weiterhin der Einfluss von SNPs auf die Expression verschiedener Varianten in der transgenen *UGT1A-SNP*-Maus (enthält zehn funktionelle SNPs im humanen *UGT1A*-Lokus; siehe Abb. 4) untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Genomische DNA von gesunden Blutspendern und HCC-Patienten

Alle genomischen DNA-Proben wurden aus einer in der Arbeitsgruppe vorhandenen DNA-Proben-Sammlung bezogen. Es wurde die DNA von 52 gesunden kaukasischen Blutspendern (45 männlich, 7 weiblich) und 24 HCC-Patienten (21 männlich, 3 weiblich) auf SNPs im *UGT1A10*-Promotor untersucht. Dazu wurden die Basenpaare -1 bis -1000 von *UGT1A10* amplifiziert und danach unter Verwendung der Primern UGT1A10-1000 Nhe F, UGT1A10-500 Nhe F und 1A10 Ex1+60 R (Tab.1) sequenziert.

2.1.2 Humane Zelllinien

KYSE70: humane Ösophagus-Karzinomzelllinie (DSMZ, No: ACC 363)

HepG2: humane Hepatoma-Zelllinie (DSMZ, No: ACC 180)

CaCo2: humane Kolon-Karzinomzelllinie (DSMZ, No: ACC 169)

2.1.3 Humanisierte transgene *UGT1A-WT*- und *UGT1A-SNP*-Mauslinie

Für die Untersuchung der verschiedenen *UGT1A*-Transkriptvarianten (v1, v2 und v3) auf mRNA-Level und für die Induktion der humanen UGTs durch Kaffee im Mausmodell standen eine humanisierte transgene *UGT1A-WT*- und eine *UGT1A-SNP*-Mauslinie zur Verfügung. Die beiden Mauslinien enthielten bis auf die Gene *UGT1A8* und *UGT1A10* den gesamten humanen *UGT1A*-Lokus, wobei der *UGT1A*-Lokus der *tgUGT1A-SNP*-Mauslinie zehn häufig in der Bevölkerung vorkommende SNPs enthielt (Abb.4). Der humane *UGT1A*-Lokus wurde jeweils vor einen C57BL/6J-Hintergrund eingebracht. Mit beiden Linien wurde eine Genkopienanalyse mittels quantitativer real time-PCR durchgeführt. Die *tgUGT1A-WT*-Maus enthielt sechs Genkopien, die *tgUGT1A-SNP*-Maus fünf Genkopien des humanen *UGT1A*-Lokus. Alle Kopien

befanden sich auf einem Chromosom, wie durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) nachgewiesen wurde. Mäuse der *tgUGT1A*-Mauslinien wurden jeweils mit nicht transgenen C57BL/6J-Mäusen verpaart und die DNA aus der Schwanzspitze der Nachkommen auf Vorhandensein des *UGT1A3*-Gens untersucht. Die positiven Mäuse wurden nach acht Wochen behandelt und/ oder für die Organentnahme getötet.

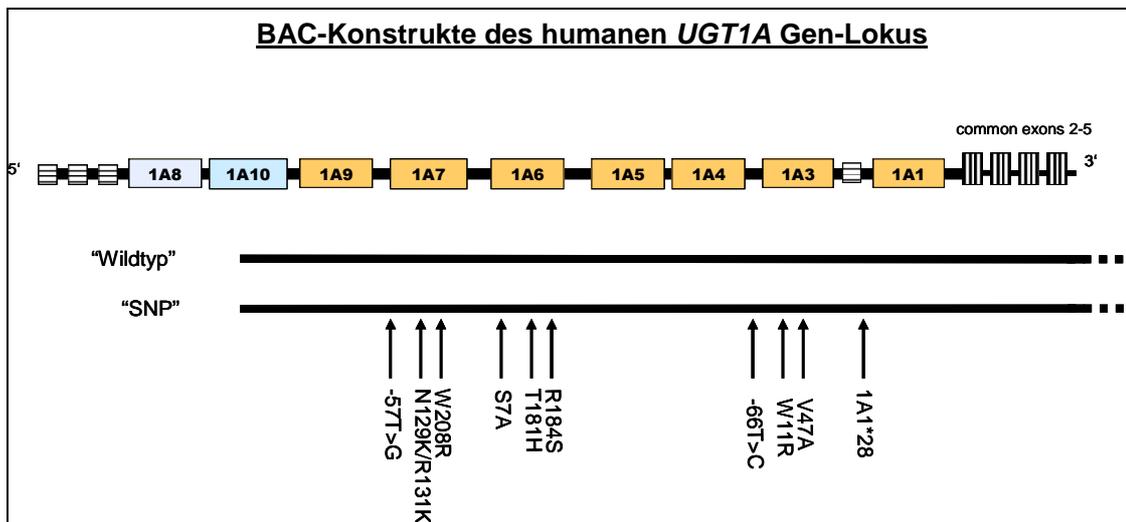


Abb.4: Schematische Darstellung des humanen *UGT1A*-Lokus und der hergestellten BAC-Konstrukte, die die Gene *UGT1A1*, *UGT1A3*, *UGT1A4*, *UGT1A5*, *UGT1A6*, *UGT1A7* und *UGT1A9* enthielten. Das „SNP“-BAC-Konstrukt enthielt im Gegensatz zum „WT“-BAC-Konstrukt einige häufig in der Bevölkerung vorkommende Polymorphismen.

2.1.4 Plasmide

pGL3-Basic Vector (Promega)

pRL-TK Vector (Promega)

2.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide für Amplifizierung und Mutagenese

Bezeichnung	Orientierung	Schnittstelle	Nukleotidsequenz (5'-3')
Hum Actin F	Forward	-	GGCGGCACCACCATGTACCCT
Hum Actin R	Reverse	-	AGGGGCCCGGACTCGTCATACT
Hum AhR RT F	Forward	-	CTGCCTTCCCACAAGATGT
Hum AhR RT R	Reverse	-	GAAATTCAGCTCGGTCTTCG

Hum Nrf2 RT F	Forward	-	GGCCCATGATGTTTCTGAT
Hum Nrf2 RT R	Reverse	-	AGCGGCTTGAATGTTTGTCT
Hum 1A10 RT F	Forward	-	CCAATGAAGACCATGTTGGGC
Hum 1A10 RT R	Reverse	-	CCTCTTTCCTATGTCCCAATGA
UGT1A1 v1/2/3 F	Forward	-	GAGAGAGGTGACTGTCCAGGAC
UGT1A3 v1/2/3 F	Forward	-	GTGGTGGATATTCTCAGTC
UGT1A4 v1/2/3 F	Forward	-	TCCTTCCTCCTATATTCCTAAG
UGT1A5 v1/2/3 F	Forward	-	TTGCTGGGTCACACTCAATC
UGT1A6 v1/2/3 F	Forward	-	GATGTGGATATAATCACCTTATATC
UGT1A7 v1/2/3 F	Forward	-	CGCTGGACGGCACCATTG
UGT1A9 v1/2/3 F	Forward	-	CATGCACTTGGAGGAACATTTATTA
UGT1AExon2 F	Forward	-	GAATTTGAAGCCTACATTAATGCTTC TGGAGAACA
UGT1A v1 R	Reverse	-	TCAATGGGTCTTGGATTTGTGG
UGT1A v2/3 R	Reverse	-	TCACATCTGTCTTCCTGACTGC
UGT1A v2 R	Reverse	-	CAACAGTGCAGGGAAAGAAGTCAGG
UGT1A v3 R	Reverse	-	GCAGTCAGGAAGACAGATGTG
1A1 -500 Nhe F	Forward	<i>Nhe I</i>	AGG AGG CTA GCA CAT GAT ACA AGT GAG CAG GC
1A1 -1000 Nhe F	Forward	<i>Nhe I</i>	GGT TGG CTA GCG CTG AGC CCT GAG TGG CTG AGG
1A1 vor ATG Xho R	Reverse	<i>Xho I</i>	TTT AAC TCG AGG GCG CCT TTG CTC CTG CCA G
1A1XRE -102Mut F	Forward	-	GCT TTT TAT AGT AAT TAA ACA CAG TC
1A1XRE -102Mut R	Reverse	-	GAC TGT GTT TAA TTA CTA TAA AAA GC
1A1XRE -586Mut F	Forward	-	GGC TCA CCT CAT GGC AAT TAC TCG TGT GG
1A1XRE -586Mut R	Reverse	-	CCA CAC GAG TAA TTG CCA TGA GGT GAG CC
1A1XRE -706Mut F	Forward	-	CTC TAC CCC AGA ATT ACC CCC ACC CC
1A1XRE -706Mut R	Reverse	-	GGG GTG GGG GTA ATT CTG GGG TAG G
1A1ARE -96 Mut F	Forward	-	TAT AGT CAC GTG AAA TTT AAA

			AAC ATT AAC
1A1ARE -96 Mut R	Reverse	-	GTT AAT GTT TTT AAA TTT CAC GTG ACT ATA
1A3 -258 Nhe F	Forward	<i>Nhe I</i>	TCT AGC TAG CAC TTG GAT GTT CCC CAG AG
1A3 vor ATG Xho R	Reverse	<i>Xho I</i>	GTG GCT CGA GCT CAG CAG AAG ACA CG
1A4 -513 bp Nhe F	Forward	<i>Nhe I</i>	TTT AAG CTA GCC CTG AAC ACT CTC TGT TT
1A4 vor ATG Xho R	Reverse	<i>Xho I</i>	TTT AAC TCG AGC TCA GCA GAA GCC ACC G
1A7 -530 NheI F	Forward	<i>Nhe I</i>	TTT AAG CTA GCT CCC AGC TAC TGA GGC TGA GGC AGG
1A7 vor ATG Xho R	Reverse	<i>Xho I</i>	AAA TTC TCG AGC AGC AGA GAA CTT CAG CCC AGA GCC
1A7XRE -100 Mut F	Forward		ATG AAT AAG TAA TTT GCT TCT TTT GAG GGC
1A7XRE -100 Mut R	Reverse		GCC CTC AAA AGA AGC AAA TTA CTT ATT CAT
1A7ARE -143 Mut F	Forward		TAT GAG TAA AAA ATT TAA AGT GAA TGT GA
1A7ARE -146 Mut R	Reverse		TCA CAT TCA CTT TAA ATT TTT TAC TCA TA
1A7ARE -187 Mut F	Forward		CAT ATA AGC AAA ATT TAA AGC AAA GGC TA
1A7ARE -187 Mut R	Reverse		TAG CCT TTG CTT TAA ATT TTG CTT ATA TG
1A8 -500 Nhe F	Forward	<i>Nhe I</i>	GCCAGCTAGCGCTGGGAAGTCGGTG CTAAGG
1A8 vor ATG Xho R	Reverse	<i>Xho I</i>	TTTAACTCGAGAGAGAACTGCAGCC CGAGCC
1A8XRE -101 Mut F	Forward	-	GGATAAATAAAATTCCTCTATTGGGG TC
1A8XRE -101 Mut R	Reverse	-	GACCCAATAGAGGAATTTTATTAT CC
1A8ARE -149 Mut F	Forward	-	TATGAGTAAAAAATTTAAAGTGAGT GTGA

1A8ARE -149 Mut R	Reverse	-	TCACACTCACTTTAAATTTTTTACTCA TA
1A9 -530 Nhe F	Forward	<i>NheI</i>	AAATTGCTAGCAATATGTATGCATTG CAGAG
1A9 vor ATG Xho R	Reverse	<i>XhoI</i>	AAATTCTCGAGCAGCAGAGAAGCTGC AGCTG
1A9XRE -101 Mut F	Forward	-	GGATAAAAAAAAAATTCCTCTATTGGG GTC
1A9XRE -101 Mut R	Reverse	-	GACCCAATAGAGGAATTTTTTTAT CC
1A9ARE -143 Mut F	Forward	-	TTTGGGTAAAAAATTTAAAGTGACTG ATTT
1A9ARE -143 Mut R	Reverse	-	AAATCAGTCACTTTAAATTTTTTACC CAAA
1A9ARE -143 Mut like 1A10 F	Forward	-	TATGAGTAAATCATTGGCAGTGAGTG
1A9ARE -143 Mut like 1A10 R	Reverse	-	CACTCACTGCCAATGATTTACTCATA
1A9ARE -143 Mut like 1A10,,T“ F	Forward	-	TTTGGGTAAATCATTGGCAGTGACTG AT
1A9ARE -143 Mut like 1A10,,T“ R	Reverse	-	ATCAGTCACTGCCAATGATTTACCCA AA
1A10 -500 Nhe F	Forward	<i>NheI</i>	GAGATGCTAGCGAGCCCCAGT TTCTTGCCAGTTG
1A10 -1000 Nhe F	Forward	<i>NheI</i>	CATTCGCTAGCGGATCCATGCCCATG ACCCAAAC
1A10 vor ATG Xho R	Reverse	<i>XhoI</i>	TTTAACTCGAGAGAGAACTGCAGCC CGAGCC
1A10 Ex1+60 R	Reverse		GCT TCC CTG CCT CGG CAA AGC CAC
1A10XRE -101 Mut F	Forward	-	GGATAAATAAAATTCCTCTATTGGGG TC
1A10XRE -101 Mut R	Reverse	-	GACCCAATAGAGGAATTTTATTTAT CC
1A10XRE -136 Mut F	Forward	-	ATCATTGGCAGTGAAAATTATTTTTT
1A10XRE -136 Mut R	Reverse	-	AAAAAATAATTTTCACTGCCAATGAT
1A10XRE -176 Mut F	Forward	-	CAGCAAATGATACAAATTTGTTATCG

			TTC
1A10XRE -176 Mut R	Reverse	-	GAACGATAACAAATTTGTATCATTTG CTG
1A10XRE -256 Mut F	Forward	-	CTAAACTCACTTGCAATATACTCTCC CTC
1A10XRE -256 Mut R	Reverse	-	GAGGGAGAGTATATTGCAAGTGAGT TTAG
1A10ARE -149 Mut F	Forward	-	TATGAGTAAAAAATTTAAAGTGAGT GTGA
1A10ARE -149 Mut R	Reverse	-	TCACACTCACTTTAAATTTTTTACTCA TA
1A10XRE -136+ ARE-149Mut F	Forward	-	CTTATGAGTAAAAAATTTAAAGTGA AAATT
1A10XRE -136+ ARE-149Mut R	Reverse	-	AATTTTCACTTTAAATTTTTTACTCAT AAG
1A10ARE -149 Mut like1A9 „T“ F	Forward	-	TTTGGGTAAATCATTGTCAGTGACTG
1A10ARE -149 Mut like1A9 „T“ R	Reverse	-	CAGTCACTGACAATGATTTACCCAAA
1A10ARE -149 Mut like1A9 F	Forward	-	TATGAGTAAATCATTGTCAGTGAGTG
1A10ARE -149 Mut like1A9 R	Reverse	-	CACTCACTGACAATGATTTACTCATA
1A10Ex1+60 R	Reverse	-	GCTTCCCTGCCTCGGCAAAGCCAC
pGL3 F	Forward	-	CTAGCAAATAGGCTGTCCC
pGL3 R	Reverse	-	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCC

Tab.1: Liste verwendeter Oligonukleotide für Amplifizierung und Mutagenese (alle Primer wurden von der Firma MWG bezogen).

Oligonukleotide für Genexpressionsstudien mittels TaqMan PCR

Gen	Primer und Sonden
UGT1Aall	Forward: GCTATGGCAATTGCTGATGCTTT Revers: CGATGGTTCGGGTCCAGTGTA Sonde: FAM – AAAATCCCTCAGACAGTCCT – MGB
UGT1A1	Forward: GAATCAACTGCCTTCACCAAAT

	Revers: AGAGAAAACCACAATTCCATGTTCT Sonde: FAM – CTATCCCAGGAATTTGAA – MGB
UGT1A3	Forward: CAGAAGTATGGCAATGTTGAACAATA Revers: GCCTCATTATGTAGTAGCTCCACACA Sonde: FAM – TCTTTGGTCTATCATAGGTC – MGB
UGT1A4	Forward: TTTTTCTGCCCCTTATGCAAGT Revers: ACAGCCACACGGATGCATAG Sonde: FAM –TCAGAGAGAGGTGTCAGTGGTGGATCTTGT- TAMRA
UGT1A5	Forward: CCATTTTCATGGACCCAGGAC Revers: AGAAGATGTTCTGTTTCAAAGAACGA Sonde: FAM –AATTTGATCGCCTTTTGCTGGGTCACA- TAMRA
UGT1A6	Forward: CTTTCATTGGAGGTATCAACTGTAAGAA Revers: AAGAGAAAACCACAATTCCATGTTT Sonde: FAM-AGGAAAGACTTGTCTCAGGAATTTGAAGCC-TAMRA
UGT1A7	Forward: GAGGATCAGGACCGGGAGTT Revers: GAAAATGCACTTCGCAATGGT Sonde: VIC – TGGTTTTTGCCGATGCT – MGB
UGT1A8	Forward: GGAGGATCTGGACCGGGAA Revers: TGGATGAACTCAGAAATAGAGAAAACAA Sonde: FAM-TGGATTTTCGCCGATGCTCAATGG -TAMRA
UGT1A9	Forward: AAACCCGTGATGCCCAAC Revers: GGCTTCAAATTCCATAGGCAAC Sonde: FAM – TGATCTTCATTGGTGGTATCAACTGCCATC - TAMRA
UGT1A10	Forward: ACCTCGTACACTCTGGAAGATCAGA Revers: GAACTCATTAATAGAGAAAATATACTTTGTGCC Sonde: FAM- AATTCATGGTTTTCGCCCATGCTCA -TAMRA
Actin human	Forward: TGCCGACAGGATGCAGAAG Revers: GCCGATCCACACGGAGTACT Sonde: FAM-AGATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC-TAMRA
Actin Maus	Forward: ACGGCCAGGTCATCACTATTG Revers: CAAGAAGGAAGGCTGGAAAAG Sonde: FAM-CAACGAGCGGTTCCGATGCCC-MGB

Tab.2: Liste verwendeter Primer und Sonden für die TaqMan-PCR (alle TAMRA-Sonden und Primer wurden von der Firma MWG, alle MGB-Sonden von Applied Biosystems bezogen).

Oligonukleotide für den Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'-3')
ARE Konsensus	Forward:AGAATGCTGAGTCACGGTG Reverse:CACCGTGACTCAGCATTCT
XRE Konsensus	Forward:GGGATCGCGTGACAACCC Reverse:GGGTTGTACGCGATCCCC
PPAR γ Konsensus	Forward:CAAACTAGGTCAAAGGTCA Reverse:TGACCTTTGACCTAGTTTTG
1A10XRE -101	Forward:GAAAGGATAAATACACGCCCTCTATTGGGG Reverse:CCCCAATAGAGGGCGTGTATTTATCCTTTC
1A10ARE -149	Forward:TATGAGTAAATCATTGGCAGTGAGTGTGAT Reverse:ATCACACTCACTGCCAATGATTTACTCATA
1A10ARE -149 +XRE-136 Mut	Forward:TATGAGTAAATCATTGGCAGTAAATTTGAT Reverse:ATCAAATTTACTGCCAATGATTTACTCATA
1A10XRE-136	Forward:GGCAGTGAGTGTGATTTTTTTTTTTT Reverse:AAAAAAAAAATCACACTCACTGCC

Tab.3: Liste verwendeter Oligonukleotide für den EMSA (alle Oligonukleotide für den EMSA lagen einmal mit Biotin-Markierung und einmal nicht-markiert vor und wurden von der Firma MWG bezogen).

2.1.6 siRNA

Die siRNA-Auswahl erfolgte durch Begutachtung der bereits in der Literatur veröffentlichten siRNAs für humanes AhR und Nrf2. Die siRNA, die am häufigsten in der Literatur gebraucht und die effektivste Herunterregulation des Zielgens bewirkte, wurde für die Versuche in dieser Arbeit ausgewählt.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
Nrf2-siRNA	AAGAGUAUGAGCUGGAAAACTT
AhR-siRNA	AAGCGCAUAGAGACCGACUUTT
Kontroll- siRNA	UAAUGUAUUGGAACGCAUATT

Tab.4: Liste verwendeter siRNA's (Herkunft: MWG)

2.1.7 Enzyme und dNTPs

Enzym	Units (U)/ μ l	Firma
Restriktionsenzyme		
<i>Nhe I</i>	10	New England Biolabs
<i>Xho I</i>	20	New England Biolabs
DNA-Polymerasen		
BioTherm™ Taq DNA Polymerase	5	Genecraft
SuperScript™ III RT	200	Invitrogen
HotGoldStar DNA Polymerase	5	Eurogentec
Ligase		
T4-DNA-Ligase	400	New England Biolabs
Phosphatase		
Antarctic Phosphatase	5	New England Biolabs
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		Genecraft

Tab.5: Liste verwendeter Enzyme

2.1.8 DNA- und Protein-Marker

100 bp DNA Ladder (Genecraft)

1 kb DNA Ladder (Genecraft)

SDS-PAGE Standards, Low Range (BioRad)

2.1.9 Antikörper

Humanes Antigen	Genaue Bezeichnung	Spezies	Herkunft	Verwendung
AhR	N-19	Ziege	Santa Cruz	EMSA
AhR	C-18	Ziege	Santa Cruz	Western Blot
Nrf2	C-20	Kaninchen	Santa Cruz	EMSA und Western Blot
β -Actin	AC-15	Maus	Santa Cruz	Western Blot
UGT1A all		Kaninchen	<i>Strassburg et al. J Biol Chem 1998 (14)</i>	Western Blot

Tab.6: Liste verwendeter Primär-Antikörper

Sekundär-Antikörper

Kaninchen anti-Ziege IgG, HRP Konjugat (Chemicon)

Maus anti-Kaninchen IgG, HRP Konjugat (Chemicon)

Ziege anti-Maus IgG, HRP Konjugat (Jackson ImmunoResearch)

2.1.10 Bakterienstämme und Medien für die Kultivierung

Escherichia coli **JM109**, relevanter Genotyp: e14-(McrA-) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17*(rK- mkt) *supE44 relA1 Δ(lac-proAB)* [F⁺tra D36 *proAB lacI^qZΔM15*]

- Ampicillin 1000x: 100 mg/ml
- LB-Agar: Hefe 5g/l, Pepton 10 g/l, NaCl 10 g/l, Agar 15 g/l
- LB-Medium: Hefe 5 g/l, Pepton 10 g/l, NaCl 10 g/l
- Medium für die Herstellung von chemisch kompetenten JM109: LB-Medium + 20 mM MgSO₄

2.1.11 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

- Accutase (PAA)
- Foetal Bovine Serum (FCS) Standard Quality (PAA)
- Gibco DMEM + GlutaMAXTM-I (Invitrogen) versetzt mit 10% FCS, 1% NEAA und 1% P/S für CaCo2 Zellen
- Gibco MEM NEAA 100x (nicht essentielle AS) (Invitrogen)
- Gibco RPMI 1640 + GlutaMAXTM-I (Invitrogen) versetzt mit 10% FCS und 1% P/S für KYSE70 und HepG2 Zellen
- OPTI-MEM[®] + GlutaMAXTM-I (Invitrogen)
- PBS 10x (Invitrogen)
- Penicillin/Streptomycin (P/S) 10000 µg/ml (Biochrom AG)

2.1.12 Induzierende Substanzen

Substanz	eingesetzte Konzentration
2, 3, 7, 8 Tetrachlordibenzodioxin (Sigma)	5 nM
Cafestol+Kahweol (Sigma)	5, 30 und 56 μ M
Chlorogensäure (Sigma)	210 mg/ 150 ml
Grüner Tee (Meßmer) (Teebeutel)	Stammlösung: 1 Teebeutel für 150 ml Wasser → für Zellkultur: 88% Medium + 12% grüner Tee
Jacobs Krönung (gemahlener Kaffee)	Stammlösung: 1 Löffel pro Tasse (L/T) = 6 g Kaffee in 150 ml Wasser → für Zellkultur: 88% Medium + 12% Kaffee-Stammlösung
Jacobs Krönung entkoffeiniert (gemahlener Kaffee)	Stammlösung: 1 L/T = 6 g Kaffee in 150 ml Wasser → für Zellkultur: 88% Medium + 12% Kaffee-Stammlösung
Jacobs Krönung Instant Kaffee	Stammlösung: 1 L/T = 2 g Instant Kaffee in 150 ml → für Zellkultur: 88% Medium + 12% Instant Kaffee-Stammlösung
Kaffeesäure (Sigma)	100 mg/ 150 ml
Kakao (100%), schwach entölt (Krüger)	Stammlösung: 1 Löffel pro Tasse (L/T) = 6 g Kaffee in 150 ml Wasser → für Zellkultur: 88% Medium + 12% Kakao-Stammlösung
Koffein (Sigma)	100 mg /150ml
Paraxanthin (Sigma)	70 mg/ 150 ml
Schwarzer Tee (Thiele) (Teebeutel)	Stammlösung: 1 Teebeutel für 150 ml Wasser → für Zellkultur: 88% Medium + 12% schwarzer Tee
<i>tert</i> -Butylhydrochinon (<i>t</i> BHQ) (Sigma)	100 μ M
Theobromin (Sigma)	9 mg/ 150 ml
Theophyllin (Sigma)	9 mg/ 150 ml

Tab. 7: Liste der verwendeten Substanzen für die UGT1A-Induktion

Herstellung der Stammlösungen von Kaffee und Tee

Stammlösung „Kaffee“ und „entkoffeinierter Kaffee“:

- 150 ml Wasser (Aqua Spüllösung (Delta Select)) in einem Becherglas zum Kochen bringen
- Von der Heizplatte nehmen, 10 sec abkühlen lassen, 6 g Kaffeepulver dazugeben und umrühren
- 1 min inkubieren lassen, danach mittels Kaffeefilter (Melitta classic) abfiltern und bei 4 °C lagern

Stammlösung Instant Kaffee:

- 150 ml Wasser in einem Becherglas zum Kochen bringen
- Von der Heizplatte nehmen, 10 sec abkühlen lassen, 2 g Instant Kaffee hinzufügen, umrühren und bei 4 °C lagern

Stammlösung French Press Kaffee:

- 150 ml Wasser in einem Becherglas zum Kochen bringen
- Von der Heizplatte nehmen, 6 g Kaffeepulver (koffeinhaltig) dazugeben, umrühren und 1 min inkubieren lassen
- Durch ein Metallsieb gießen und bei 4 °C lagern

Stammlösung Kakao:

- 150 ml Wasser in einem Becherglas zum Kochen bringen
- Von der Heizplatte nehmen, 10 sec abkühlen lassen, 6 g Kakaopulver hinzufügen und umrühren (Kakao-Stammlösungen wurden immer frisch angesetzt).

Stammlösung „grüner Tee“ und „schwarzer Tee“:

- 150 ml Wasser in einem Becherglas zum Kochen bringen
- Von der Heizplatte nehmen, Wasser für grünen Tee 1 min abkühlen lassen, dann den Teebeutel für 3 Minuten im Wasser halten; für schwarzen Tee den Teebeutel direkt ins Wasser geben und 3 Minuten ziehen lassen (beide Teestammlösungen wurden immer frisch angesetzt)

2.1.13 Kits

- Big Dye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (Pierce)
- Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega)
- NuceloBond[®] PC 500 (Machery-Nagel)
- NucleoSpin[®] Extract II (Machery-Nagel)
- NucleoSpin[®] Plasmid (Machery-Nagel)
- QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
- qPCR MasterMix Plus (Eurogentec)
- SuperScript[™] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)

2.1.14 Puffer und Gebrauchslösungen

- 3 M Natriumacetat: 4,1 g NaAc in 50 ml Wasser
- Ladepuffer: 50% Glycerol, 0,2% Orange-G, Rest 1x TAE
- Passive Lysis 5X Buffer (Promega)
- PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM NaH₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄
- Puffer 2 (New England Biolabs): 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT
- Puffer 3 (New England Biolabs): 100 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT
- Puffer 4 (New England Biolabs): 50 mM Kaliumacetat, 20 mM Tris-Acetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM DTT
- Puffer für Antarktische Phosphatase (New England Biolabs): 50 mM Bis Tris-Propane, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂, pH 6.0
- Puffer für BioTherm Taq DNA Polymerase (Genecraft): 160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl pH 8.8 (at 25°C), 15 mM MgCl₂, 0.1% Tween 20
- Puffer für T4-DNA-Ligase (New England Biolabs): 500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP, 250 µg/ml BSA
- TAE-Puffer 50x: 0,8 M Tris Base, 0,2 M NaAcetat, 20 mM EDTA, pH 7,8

Puffer für die Herstellung von chemisch kompetenten E.coli JM109-Zellen

- TFB1: 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 15% Glycerol (pH 5,8 mit 1 M Essigsäure einstellen)
- TFB2: 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15% Glycerol (pH 6,5 mit 1 M KOH einstellen)

Puffer für den Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA):

- 5x Bindepuffer: 50 mM Tris HCl (pH 8.0), 750 mM KCl, 2,5 mM EDTA, 0.5% Triton-X 100, 62.5% Glycerol, 1mM DTT
- HEDG-Puffer: 1 M Hepes, 0,5 mM EDTA, 1 M DTT, 10% Glycerol
- TBE-Puffer 10x: 890 mM Tris Base, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA

Puffer für Herstellung von nukleären Extrakten:

- HDK: 25 mM Hepes pH 7,5, 1 mM DTT, 0,4 mM KCl
- MDH: 3 mM MgCl₂·6H₂O, 25 mM Hepes pH 7,5, 1 mM DTT
- MDHK: 3 mM MgCl₂·6H₂O, 25 mM Hepes pH 7,5, 1mM DTT , 0,1 mM KCl

Puffer für die Herstellung von Mikrosomen:

- UGT-Puffer: 0,5 M Tris, 0,1 M MgCl₂

Puffer für Western Blots

Puffer	Zusammensetzung
Trenngelpuffer 4x	181,7 g Tris 40 ml 10% SDS auf 1000 ml auffüllen und pH 8,8 einstellen
Sammelgelpuffer 4x	60,6 g Tris 12 ml 10% SDS auf 1000ml auffüllen und pH 6,8 einstellen
Laufpuffer 10x	30 g Tris 144 g Glycin 100 ml 10% SDS auf 1000 ml auffüllen
Transferpuffer	3,03 g Tris 24,41 g Glycin 100 ml Methanol und auf 1000 ml auffüllen

Lämmli-Puffer 2x	10 ml Glycerol 10 ml 10% SDS 12,5 ml Sammelgelpuffer 10 ml DTT Spatelspitze Bromphenolblau auf 50 ml auffüllen
PBST	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM NaH ₂ PO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 0,1% Tween-20

Tab.8: Liste verwendeter Puffer für den Western Blot

2.1.15 Chemikalien

30%ige Acrylamidstammlösung: rotiphorese[®] Gel 30 (Roth)

Agarose NEEO, ROTIGAROSE[®] (Roth)

Ammoniumpersulfat (APS)

Ampicillin (Roth)

Aqua Spüllösung (Delta Select)

Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad)

Chloroform (J.T. Baker)

DEPC-treated Water (Ambion)

DMSO für Zellkultur (Sigma)

Ethanol 99,9% (J.T. Baker)

Ethidiumbromid (Sigma)

Hi-Di[™] Formamid (Applied Biosystems)

Isopropanol (J.T. Baker)

Lipofectamine[™] 2000 Transfection Reagent (Invitrogen)

Lipofectin Transfection Reagent (Invitrogen)

Magermilchpulver (SUCOFIN[®])

Methanol (J.T. Baker)

Performance Optimized Polymer 6 (POP-6) (Applied Biosystems)

Pierce[®] ECL Western Blotting Substrate

Poly-deoxy-inosinic-deoxy-cytidylic acid (Poly[d(I-C)]) (Roche)

Tetramethylethyldiamin (TEMED)

TRIzol[®] Reagent (Invitrogen)

Tween 20 (Merck)

2.1.16 Verbrauchsmaterialien

6-Well Platten (Greiner Bio-One)

8er SoftStrips 0,2ml (Biozym)

12-Well Platten (Greiner Bio-One)

Falconröhrchen 15 ml, 50 ml (Sarstedt)

Greinerröhrchen (Greiner Bio-One)

Kaffeefilter Classic (Melitta)

Medical X-Ray Filme: Cronex 5 (AGFA)

PCR Platten twin.tec. 96 (Eppendorf)

Plastikküvetten für Photometer (Sarstedt)

Plastikpetrischalen (Sarstedt)

Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (Sarstedt)

Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl (Sarstedt)

Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl mit Filter (StarLab)

Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Sarstedt)

Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman)

Whatman Papier (Whatman GmbH)

Zellkulturflaschen klein(75 cm²) und groß (175 cm²) (Sarstedt)

Zellschaber (Sarstedt)

2.1.17 Sonstige Materialien

Biodyne[®] B Membran für EMSA 0,45 µm (Pall Corporation)

Bio-Rad Trans Blot[®] Transfer Medium: Nitrocellulose Membran 0,45 µm

Blotting-Kammer-System (Bio-Rad)

Gelelektrophoresekammern (Bio-Rad, SCIE-PLAS)

Neubauer Zählkammer (Marienfeld)

Potter-Elvehjem Homogenisator

X-Ray Kassette

Metallsieb

2.1.18 Geräte

ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)

ABI PRISM[™] 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Applied Biosystems)

Brutschrank für Zellkultur (Haraeus)

Concentrator (Eppendorf, 5301)

Crosslinker Stratalinker[®] 1800 (Stratagene)

Durchlichtmikroskop (Nikon)

Entwicklermaschine Optimax (protec)

Heizblock für 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Thermomixer 5436)

Kühlzentrifuge für 15 ml und 50 ml Falcons (Beckman, GS-6KR)

Kühlzentrifuge für 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, 5403)

Lamina Flow (Integra Biosciences)

Luminometer Lumat LB 9507 (Berthold)

Magnetrührer/Heizplatte (Heidolph, ME 3001)

PCR-Maschinen (Biometra-T personal; Perkin Elmer- GeneAmp PCR Systems 2400;
Stratagene-Robocycler Gradient 96)

pH-Meter (Calimatic, 766)

Photometer (Pharmacia Biotech, Ultraspec[®]3000)

Power Supply für Acrylamidgelelektrophorese (Bio-Rad, Power Pac 300)

Power Supply für Agarosegelelektrophorese (Consort, E835)

Schüttler (GFL, 3013)

Schüttler mit Wärmefunktion (Bühler Labtec)

Ultra-Turrax T8 (IKA Labor Technik)

UV-Lichtanlage zur Geldokumentation (Bachofer)

Vortexer (Heidolph)

Zentrifuge für 0,5 ml und 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, 5415D)

Zentrifuge für 500 ml Zentrifugenröhrchen (Beckman, Avanti[™] J-30 I)

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifizierung von spezifischen DNA-Sequenzen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde eine Biotherm™ Taq DNA Polymerase (Tab.5) verwendet. Die PCR erfolgte bei Primern mit Schnittstellenüberhängen mittels Temperaturgradienten. Dazu wurden die ersten 10 Zyklen mit einer niedrigeren Annealing-Temperatur durchgeführt als die darauf folgenden 25 Zyklen. Bei einer Duplex-PCR wurde gleichzeitig in einem Ansatz eine PCR für ein bestimmtes Gen (*UGT1A*, *Nrf2* oder *AhR*) und für Actin durchgeführt. Dazu wurden nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen zu einem Standard-PCR Ansatz jeweils 5 µM Actin Forward und 5 µM Actin Reverse (Tab.1) gegeben und die PCR bis zur Vollendung der vollständigen Zyklenanzahl laufen gelassen.

Standard PCR-Ansatz (Gesamt Volumen 50 µl):

2 µl DNA (ca. 10-100 ng)

2,5 µl Biotherm Reaction Buffer (10x)

1,25 µl Primer Forward (10 µM)

1,25 µl Primer Reverse (10 µM)

0,5 µl dNTP (10 mM)

0,25 µl (1 U) Biotherm Taq DNA Polymerase

17,25 µl H₂O

Standard-PCR-Programm:

94 °C	5 min	1 Zyklus
94 °C	30 sec	25 bis 40 Zyklen
52-65 °C	30 sec	
72 °C	1 min pro 1 kb zu amplifizierender Sequenz	
72 °C	7 min	1 Zyklus

Tab.9: Parameter eines Standard-PCR-Programms

Spezielle PCR-Konditionen:

Zu amplifizierende Sequenz	Primer	Temperaturen und Zeiten	Zyklusanzahl	Evtl. Actin-Primer Zugabe bei Duplex-PCR
Humanes AhR	Hum AhR RT	94 °C 30 sec 58 °C 30 sec 72 °C 1 min	31	nach 10 Zyklen
Humanes Nrf2	Hum Nrf2 RT	94 °C 30 sec 58 °C 30 sec 72 °C 1min	25	nach 5 Zyklen
Humanes UGT1A10	Hum 1A10 RT	94 °C 45 sec 59 °C 45 sec 72 °C 45 sec	35	nach 16 Zyklen
Alle durchgeführten Mutagenese-PCR's	siehe Tab.1	94 °C 30 sec 58 °C 30 sec 72 °C 1 min	30	-
pGL3 Plasmid Überprüfung des Inserts (Klon-PCR)	pGL3	94 °C 30sec 58 °C 30 sec 72 °C 1 min pro Kilobase	25	-

Tab.10: Aufführung individueller PCR-Konditionen für verschiedene Amplikons (Die Primer Hum Actin F und R wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt; 1 µl des Gemischs (Stammlösung 10 µM) wurde dem PCR-Ansatz nach Ablauf einer Elongationsphase zugeführt.)

UGT1A-Transkriptvarianten PCR (Detektierung von v1, v2 und v3):

Als Template dienten 2 µl der cDNA, die aus der RNA von Leber, Magen, Jejunum, Kolon und Niere aus transgenen *UGT1A*-Mäusen generiert wurde. Für die Detektierung der Variante 1 (v1) von *UGT1A1* wurden z.B. die Primer UGT1A1 v1/2/3 F und UGT1A v1 R und für die Variante 2/3 (v2/3) die Primer UGT1A1 V1/2/3 F und UGT1A1 V2/3R (Tab.1) benutzt. Es wurde eine Duplex-PCR durchgeführt, die nach Standard-Bedingungen mit einer Annealing-Temperatur von 58 °C für 40 Zyklen erfolgte. Nach 10 Zyklen wurden je 5 µM Actin F und Actin R Primer (Tab.1) hinzugegeben und die PCR fortgesetzt.

2.2.2 Mutagenese von potentiellen DNA-Bindungselementen

Schritt 1: Um potentielle DNA-Bindungselemente in den Promotoren zu mutagenisieren, wurden zunächst zwei verschiedene PCR-Ansätze hergestellt (Abb.5). Der erste enthielt den Forward-Primer des zu amplifizierenden Promotorstücks sowie den Reverse-Mutagenese-Primer. Der zweite PCR-Ansatz wurde mit dem Forward-Mutagenese-Primer und dem Reverse-Primer des zu amplifizierten Promotorstücks versetzt. Als Template dienten jeweils 50 ng des pGL3-Vektors, der das gewünschte Promotorstück in der Wildtyp-Form enthielt.

Schritt 2: Nach einer Agarosegelaufreinigung (siehe 2.2.4) wurden je 0,5 µl beider PCR's aus Schritt 1 in eine neue PCR eingesetzt. Initial kam es in dieser PCR zu einem Annealing der mutagenisierten DNA-Bindestellen (Abb.5 Schritt 2 a) und danach zur Amplifizierung des restlichen Promotorstückes vom 3'-OH Ende aus. Nach der folgenden Denaturierung konnten die promotorspezifischen Primer binden und das Promotorstück mit der mutagenisierten DNA-Bindungsstelle amplifiziert werden (Abb.5 Schritt 2 b). Die Aufreinigung des PCR-Produkts erfolgte mittels NucleoSpin[®] Extract II-Kit (siehe 2.2.5).

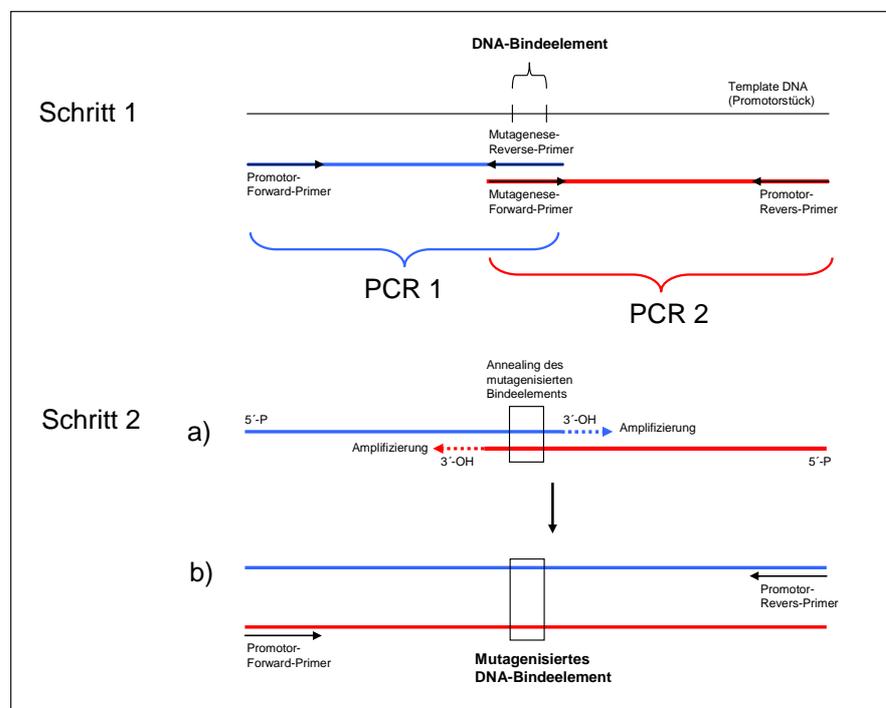


Abb.5: Schema der durchgeführten zielgerichteten Mutagenese-PCR.

2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente zur Identifizierung, Trennung, Reinheitsüberprüfung und Längenbestimmung von DNA-Molekülen (analytische Gele) sowie zur Aufreinigung von Restriktions- bzw. PCR-Fragmenten (präparative Gele). In dieser Arbeit wurden 1%ige Agarosegele verwendet, die mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid, das in die DNA interkaliert, versetzt wurden. Die Visualisierung erfolgte durch UV-Licht-Bestrahlung (280 nm) der DNA-Moleküle im Gel und die daraus resultierende Abgabe von Fluoreszenzlicht des Ethidiumbromids. Die aufzutrennende DNA-Lösung wurde mit 10x-Ladepuffer gemischt. Die Auftrennung erfolgte in Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer bei einer Spannung von 120 Volt. Die analytischen Gele wurden mit Hilfe einer UV-Dokumentationsanlage und eines computergesteuerten Programms (Software Gel Cam) dokumentiert und ausgewertet. Aus den präparativen Gelen wurden die Banden von Interesse unter dem UV-Licht detektiert und ausgeschnitten.

2.2.4 Aufreinigung von PCR- und Restriktionsfragmenten aus Agarosegelen

Zur Elution der DNA aus der Agarose wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Die DNA-Isolierung erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Im letzten Schritt wurde die DNA in 20 bis 35 µl H₂O eluiert.

2.2.5 Aufreinigung von PCR-Fragmenten mittels NucleoSpin[®] Extract II Kit

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten diente ebenfalls das NucleoSpin[®] Extract II Kit von Machery-Nagel. Mit Hilfe dieses Kits wird die DNA mittels Anionenaustauschersäule aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde im letzten Schritt in 30-50 µl H₂O eluiert.

2.2.6 Enzymatische Reaktionen bei der DNA-Klonierung

a) Restriktionen

Jeweils 5-10 µg DNA wurden mit 1/10 Volumen des entsprechenden Restriktionspuffers (10x konzentriert), 1/10 Volumen BSA (10x konzentriert) und 5-10 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease (Tab.5) versetzt, mit Wasser auf 50-80 µl aufgefüllt und je nach Enzym und zu verdauender DNA zwischen 3 und 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde der Restriktionsverdau überprüft und anschließend folgte eine 15 bis 20-minütige Inkubation bei 65°C zur Inaktivierung des Enzyms.

b) Dephosphorylierungen von DNA-Enden mit antarktischer Phosphatase

Die antarktische Phosphatase (Tab.5) bewirkt eine Steigerung der Klonierungseffizienz, indem sie eine Rezirkulation von Vektorfragmenten in Ligationsreaktionen verhindert. Pro 1 µg DNA wurden 1 U Enzym, 1/10 Volumen Puffer zugegeben, mit Wasser auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und 20 min bei 37°C inkubiert. Die Hitzeinaktivierung erfolgte bei 65 °C für 5 min.

c) Ligationen

Die Ligation von Vektor und Insert erfolgte in einem Endvolumen von 10 µl. Das Verhältnis von Vektor- zu Insert-Fragment betrug von circa 1:2 bis zu 1:10 (Vektor:Insert). Der Reaktionsansatz enthielt die benötigten Mengen an Insert- und Vektor-DNA, 10x Ligasepuffer (1/10 Vol) und 1 µl der T4-Ligase (400 U) (New England Biolabs; Tab.5). Der Ligationsansatz wurde bei 16°C über Nacht inkubiert und stand danach für die Transformation bereit.

2.2.7 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zunächst wurde eine 2,5 ml-Übernachtskultur (LB-Medium) mit einer Spatelspitze einer bei -80 °C gelagerten JM109-Flüssigkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Diese Kultur wurde am nächsten Morgen in 250 ml LB-Medium, das

20 mM MgSO₄ enthielt, gegeben und so 1:100 verdünnt. Die Zellen wurden weiterhin bei 37 °C geschüttelt bis die Kultur eine optische Dichte von 0,4-0,6 erreicht hatte. Dann wurde die Kultur auf zwei Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und bei 4500 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml eiskaltem TFB1 pro Röhrchen vorsichtig resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4500 x g für 5 min bei 4 °C wurden beide Pellets in je 5 ml TFB2 gelöst und 60 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden schließlich in 50 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.8 Chemische Transformation

Die chemisch kompetenten Zellen (*E.coli* JM109) wurden auf Eis aufgetaut. Danach wurden die Zellen mit 5-8 µl Ligationsansatz versetzt und erschütterungsfrei 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock der Zellen für exakt 45 Sekunden bei 42°C wurden die Zellen sofort für ein bis zwei Minuten auf Eis gestellt und anschließend in 800 µl vorgewärmtes LB-Medium pipettiert. Unter Schütteln folgte eine Stunde Inkubation bei 37°C und nach Ausplattieren auf eine Selektivagarplatte (Ampicillin versetzt) wurden die plasmidtragenden Zellen bei 37°C über Nacht angereichert.

2.2.9 Klonanalyse

Um zu überprüfen, ob der ausgewählte plasmidtragende Klon den gewünschten Vektor enthielt, erfolgte eine Klon-PCR. Dazu wurde Koloniematerial eines Klons mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte abgenommen und in einem PCR-Tube ausgestrichen. Die Pipettenspitze wurde anschließend dafür benutzt, eine 5 ml-Übernachtskultur anzuimpfen. Die PCR mit den Primern pGL3 F/R (Tab.1) wurde nach in Tab.10 benannten Konditionen durchgeführt. Bei negativen Klonen ergab sich bei der Überprüfung des PCR-Produkts mittels Agarosegelelektrophorese eine Bande auf Höhe von ca. 150 bp, während sich bei positiven Klonen eine Bande zeigte, die der Größe des Inserts + 150 bp entsprach. Aus den Flüssigkulturen der positiven Klone wurde im nächsten Schritt das Plasmid mittels Mini-Prep (siehe 2.2.10) gewonnen und durch

Sequenzierung überprüft. Bei positivem Befund wurden 500 µl der restlichen Flüssigkultur dazu verwendet, um eine 200 ml-Übernachtskultur anzuzüchten.

2.2.10 Plasmidisolierung und DNA-Konzentrationsbestimmung

a) Herstellung von Mini-Preps

Von einer bewachsenen Agarplatte wurden ca. 10 Kolonien gepickt und damit eine 5 ml-Übernachtskultur angeimpft. Diese wurde am nächsten Tag abzentrifugiert (1 min, 11000 x g, 20 °C) und aus dem Pellet die Plasmid-DNA mittels NucleoSpin® Plasmid-Kit (Machery-Nagel) laut Herstellerprotokoll isoliert. Die DNA wurde letztlich in 30 bis 50 µl Wasser eluiert.

b) Herstellung von Maxi-Preps

Für die Herstellung von Maxi-Preps wurde eine über Nacht gewachsene 200 ml-Flüssigkultur abzentrifugiert (15 min, 6000 rpm, 4 °C) und das Plasmid mit Hilfe des NucleoBond® PC 500 Kits (Machery-Nagel) nach Protokoll des Herstellers isoliert. Das DNA-Pellet wurde in 100-300 µl Wasser aufgenommen.

Die Konzentrationsbestimmung von isolierten Plasmid-Lösungen wurde mit Hilfe eines Ultraspec®3000-Photometers (Pharmacia Biotech) bestimmt. Dazu wurde eine geeignete Verdünnung mit DNase-freiem Wasser hergestellt und im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

2.2.11 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen

Für die Klonanalyse wurde ca. 1 µg Plasmid-DNA mit den Primern pGL3 F bzw. pGL3 R (Tab.1) in eine Sequenz-PCR eingesetzt. Um definierte Stücke der genomischen DNA von Blutspendern zu sequenzieren wurden zunächst 100 ng genomische DNA mit entsprechenden Primern mittels PCR amplifiziert, mit dem NucleoSpin® Extract II-Kit (siehe 2.2.5) aufgereinigt und schließlich ca. 500 ng aufgereinigtes PCR-Produkt in eine Sequenz-PCR eingesetzt. Jede Sequenzierung wurde mit dem Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt.

Standard-Sequenzierungsreaktions-Ansatz (Gesamtvolumen 10 µl):

x µl DNA

1 µl Big Dye[®] (Applied Biosystems)

1 µl Primer (10 µM)

x µl H₂O

Sequenzierungsreaktions-Bedingungen:

96 °C → 1 min für eine initiale Denaturierung

96 °C → 10 sec
56 °C → 5 sec
60 °C → 4 min } 27 Zyklen

Eine Aufreinigung des Produkts erfolgte durch eine Ethanol-Fällung. Dazu wurde jeder Ansatz mit 2 µl 3 M NaAc und 50 µl 100%igem Ethanol versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation (13000 rpm, Raumtemperatur) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Es folgten eine Zentrifugation (13000 rpm, Raumtemperatur) und eine Trocknung des Pellets nach Verwerfen des Überstandes. Danach wurde das Pellet in 20 µl Hi-DiTM Formamid gelöst und in einem weiteren Schritt 1 zu 2,5 in Hi-DiTM Formamid verdünnt (Gesamtvolumen 20 µl). Diese Verdünnung wurde mit Hilfe des ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzers über kapillare Gelelektrophorese (Gelmaterial POP-6) aufgetrennt und mittels Laser ausgelesen. Zur Erfassung der Daten diente die Software Genetic Analyzer 310 Data Collection und zur Auswertung der Rohdaten die Software Sequencing Analysis 3.0 von Applied Biosystems. Das Alignment der so erhaltenen Sequenzen mit Referenzsequenzen erfolgte mit Hilfe der Software SeqManTMII (DNASTAR).

2.2.12 Zellkultur

Die Inkubation aller Zelllinien erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂. Alle Zellen wurden zweimal wöchentlich geteilt und somit ausgedünnt. Dazu wurden zunächst das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und bei 37 °C für 15-20 min mit Akkutase inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurden bei HepG2-Zellen

ca. 65%, bei CaCo2-Zellen 70 bis 80% und bei KYSE70-Zellen 90% der Zellen verworfen und die restlichen Zellen mit frischem Medium weiterkultiviert.

2.2.13 RNA-Isolierung

Die RNA wurde mittels TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) isoliert. Dazu wurden Zellen, die in kleinen Zellkulturflaschen (75 cm²) oder 6-well Platten ausgesät und 3 bis 48 h mit der induzierenden Substanz bzw. dem Kontrollreagenz inkubiert wurden, mit PBS gewaschen, mittels Akkutase abgelöst und in 5 ml Medium aufgenommen. Nach einer Zentrifugation (1000 rpm, 5 min, 4 °C) wurde das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, 4 °C). Danach wurde das Pellet in 1 ml TRIzol[®] Reagent resuspendiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit 200 µl Chloroform versetzt und 15 sec gevortext. Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur folgte eine Zentrifugation für 15 min (12000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol gemischt. Nachdem die RNA bei Raumtemperatur für 10 min gefällt wurde, erfolgten ein weiterer Zentrifugationsschritt (12000 x g, 4°C) und ein Waschen mit 1 ml 70%igem Ethanol. Das RNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich in 30-100 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Für die Isolierung von RNA aus Gewebe wurden 50-100 mg des gewünschten Organs mit 1 ml TRIzol[®] Reagent versetzt und mit Hilfe eines Ultra-Turrax homogenisiert. Die weiteren Isolierungsschritte entsprachen den oben beschriebenen.

2.2.14 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Umschreibung von RNA zu cDNA erfolgte mit Hilfe des Super Script[™] III First – Strand Synthesis System für RT-PCR von Invitrogen (siehe 2.1.13).

Ansatz und Durchführung:

x µl RNA (5 µg)

1 µl Oligo (dT) (50 µM)

1 µl dNTP Mix (10 mM)

x µl DEPC-behandeltes Wasser (Gesamt-Volumen 10 µl)

Der Ansatz wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert, danach für 1 min auf Eis gesetzt und schließlich mit 10 µl des folgenden Mastermixes versetzt:

2 µl 10X RT Puffer

4 µl MgCl₂

2 µl 0,1 M DTT

1 µl RNase OUT™ (40 U/µl)

1 µl SuperScript III RT (200 U/ µl)

Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 50 °C für 60 min. Anschließend wurden die Enzyme durch Erhitzung auf 85 °C für 5 min inaktiviert. Die RNA wurde in einem anschließenden Schritt durch Zugabe von RNase H bei 37 °C für 20 min entfernt. Für eine darauf folgende genspezifische PCR wurden 2 µl (für TaqMan PCR's 1 µl) der gewonnenen cDNA verwendet.

2.2.15 TaqMan PCR

Die TaqMan PCR ist eine mögliche Methode für eine real-time-PCR. Dabei spielen die TaqMan-Sonden eine besondere Rolle. Es handelt sich dabei um ca. 15-30 bp lange Oligonukleotide, an deren 5'-Ende ein Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende ein Quencher gebunden ist. Der Quencher fängt die Fluoreszenz von Farbstoffen in seiner unmittelbaren Nähe ab. Während der PCR bindet nun die Sonde inmitten des zu amplifizierenden Genabschnittes (zwischen Forward- und Reverse-Primer). Idealerweise sollte die zu amplifizierende Sequenz eine Länge von 80 bp nicht überschreiten. In dieser Arbeit wurde das qPCR MasterMix Plus-Kit für die TaqMan PCR verwendet. Die darin enthaltene HotGoldStar-DNA-Polymerase bindet an das freie 3'-Ende des Forward-Primers und amplifiziert die Sequenz bis zum 5'-Ende der Sonde (Abb.6). Da die Polymerase eine Nukleaseaktivität hat, ist sie dazu in der Lage die Sonde vom 5'-Ende her abzubauen. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und gelangt aus dem Einflussbereich des Quenchers. Dadurch wird die Fluoreszenz messbar, wobei ein Molekül eines Fluoreszenzfarbstoffes für einen neu gebildeten DNA-Strang steht. Somit kann man mittels der TaqMan-Sonden zu jeder Zeit der PCR die Menge an gebildeter DNA messen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Sonden- und Primersequenzen sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde sowohl 6-Carboxyfluorescein (FAM) als auch VIC verwendet. Für die Quenchermarkierung der Sonden wurden 6-Carboxy-Tetramethylrhodamine (TAMRA) und Minor Groove Binder (MGB) genutzt. Als Kontrolle für den cDNA-Gehalt der eingesetzten DNA wurde in Parallelansätzen eine PCR für β -Actin als Referenzen durchgeführt.

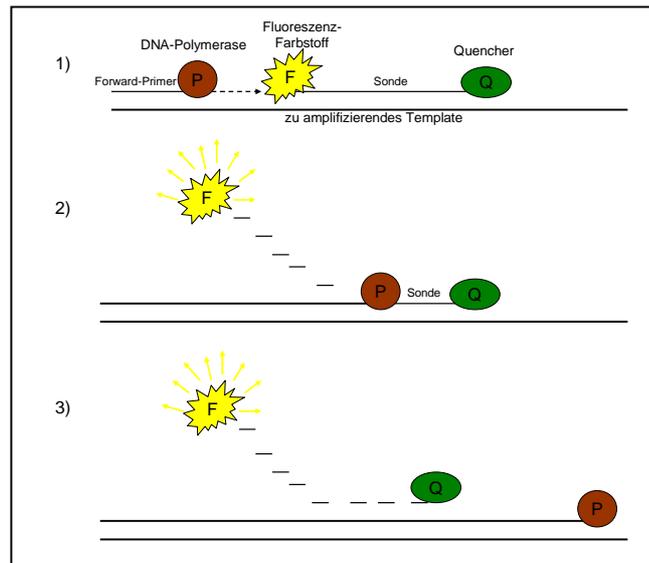


Abb.6: Schematische Darstellung der TaqMan PCR.

TaqMan PCR-Ansatz für UGT1A-Genexpressionsanalyse:

Master Mix (Eurogentec):		12.5 μ l
Sonde	100nM	0.25 μ l
Primer F	600nM	1.5 μ l
Primer R	600nM	1.5 μ l
cDNA (div. verd.)		1 μ l
dd H ₂ O auf 25 μ l		8.25 μ l

TaqMan PCR-Ansatz für β -Actin-Genexpressionsanalyse:

Master Mix (Eurogentec):		12.5 μ l
Sonde (humanes Actin)	200 nM	0.5 μ l
Sonde (murines Actin)	100 nM	0,25 μ l
Primer F	300 nM	0.75 μ l
Primer R	300 nM	0.75 μ l
cDNA (div. verd.)		1 μ l
dd H ₂ O auf 25 μ l		9.5/9,75 μ l

Für jede zu analysierende DNA-Probe wurden 2-fach- oder 3-fach-Ansätze pipettiert. Es wurden Gemische aus Master Mix (qPCR MasterMix Plus), Sonde, Primern und H₂O hergestellt und diese auf die Wells einer 96-Well PCR Platte gegeben. Zuletzt wurde 1 µl der zu analysierenden cDNA hinzupipettiert. Die PCR-Platte wurde mit einer Plastikfolie abgedeckt und mit Hilfe des ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection Systems und der Software Sequence Detection (Version 1.2.3) von Applied Biosystems analysiert.

Reaktionsbedingungen:

Temperatur	Zeit	Zyklen
50 °C	2 min	1
95 °C	10 min	1
95 °C	15 sec	} 45
60 °C	1 min	

Tab.11: Reaktionsbedingungen der TaqMan PCR

Die Normalisierung und Ermittlung der relativen Expression der verschiedenen *UGT1A*-Gene erfolgte mit Hilfe der Microsoft Excel basierten Software Qgene.

2.2.16 Luciferase-Assay

Für den Luciferase-Assay wurden an Tag 1 die gewünschten Zellen auf 12-Well-Platten ausgesät. Dazu wurden die Zellen mittels Akkutase abgelöst, mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt und schließlich die benötigte Menge ausgesät.

Benötigte Zellzahlen pro Well für verschiedene Zelllinien:

HepG2: $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Well

CaCo2: $0,6 \times 10^5$ Zellen pro Well

KYSE70: $0,75 \times 10^5$ Zellen pro Well

An Tag 2 erfolgte die Transfektion. Pro Ansatz (Well) wurden 2 µl Lipofectin mit 50 µl OPTI-MEM gemischt und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 440 µl OPTI-MEM mit je 0,8 µg Plasmid-DNA (Luciferase-

Konstrukt) und 3 ng pRL-TK Vector (Kontrolle) versetzt und schließlich mit der Lipofectin-Lösung vermengt. Dieser Ansatz wurde für weitere 15 min inkubiert, damit sich DNA-Liposomen-Komplexe bilden konnten. Die ausgesäten Zellen in den 12-Well-Platten wurden mit PBS gewaschen, mit dem Transfektionsansatz versetzt und bei 37 °C inkubiert.

Am 3. Tag wurden verschiedene induzierende Substanzen bzw. Kontrollsubstanzen auf die Zellen gegeben (Tab.7). Die weitere Inkubation erfolgte im Brutschrank für verschiedene Zeitspannen (3 – 48 h).

Nach Ablauf der gewünschten Induktionszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit passiven Lysepuffer (Promega) für 15 min (KYSE70-Zellen für 30 min) lysiert, wodurch die Luciferase freigegeben wurde. Die Messung der Lumineszenz mittels Luminometer erfolgte folgendermaßen:

- 10 µl Zelllysat wurden zu 50 µl LAR II- Reagenz pipettiert und Messung 1 gestartet
→ dadurch wird die Lumineszenz der Firefly Luciferase (*Photinus pyralis*) gemessen, die die Aktivität des getesteten Luciferase-Konstrukts in relativen Lichteinheiten widerspiegelt (Messzeit 10 sec)
- 50 µl Stop&Glo Reagent wurden hinzupipettiert und Messung 2 gestartet
→ dadurch wird die Lumineszenz der Firefly Luciferase gestoppt und die der Renilla Luciferase (*Renilla reniformis*) gestartet, die die Aktivität des TK-Vektors widerspiegelt und damit eine interne Kontrolle der Transfektion darstellt (Messzeit 10 sec)

Der Wert der ersten Messung wurde durch den der zweiten geteilt. Alle Werte wurden mit Hilfe der Microsoft Excel Software analysiert und durch die Werte des nicht-induzierten Basics (pGL3-Vektor ohne Insert) geteilt. Für die Darstellung einer x-fachen Induktion wurden die Luciferase-Aktivität des induzierten Promotor-enthaltenen Vektors durch die des nicht-induzierten Promotor-enthaltenen Vektors geteilt. Jeder Versuch wurde in Dreifachansätzen durchgeführt und wurde in 3-10 unabhängigen Versuchen wiederholt. Die Fehlerbalken einzelner Säulen stellen die Standardabweichung aller durchgeführten Versuchsansätze dar. Die statistische Auswertung für den Vergleich verschiedener Gruppen erfolgte mit Hilfe des Student's t-Tests. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, sofern der p-Wert unter 0,05 lag.

2.2.17 Herstellung von nukleären Extrakten

Für die Herstellung von nukleären Extrakten wurden die mit verschiedenen Substanzen induzierten adhären Zellen zweimal mit 5 ml eiskaltem 10 mM Hepes (pH 7,5) gewaschen und danach mit 5 ml 10 mM Hepes für 15 min auf Eis inkubiert. Das Hepes wurde entfernt und die Zellen zusammen mit 2 ml MDH und Hilfe eines Zellschabers von der Zellkulturflasche abgekratzt, in einen Potter-Elvehjem überführt und mit 15 Auf- und Abbewegungen homogenisiert. Nach Überführung in ein 2 ml-Reaktionsgefäß und einer Zentrifugation (21000 x g, 5 min, 4 °C) wurde das Pellet in 2 ml MDHK resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation unter gleichen Bedingungen und eine Wiederholung des Waschschrilles mit MDHK. Das Pellet wurde danach in 1 ml MDHK gelöst und für 2 min bei Höchstgeschwindigkeit und 4 °C zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet in 30 µl HDK aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert, wobei das Reaktionsgefäß alle 5 min geschneippt wurde. Es folgte eine Zentrifugation (14000 rpm, 15 min, 4 °C) und ein Überführen des Überstandes in ein Ultrazentrifugenröhrchen. Danach wurde ein viertel Volumen 50% iges Glycerol hinzugefügt und gemischt. Die Ultrazentrifugation wurde bei 35000 rpm und 4 °C für 1 Stunde durchgeführt. In dem Überstand befanden sich die nukleären Extrakte, deren Konzentration mit Hilfe der Bradford-Methode (Bio-Rad Protein-Assay-Lösung) photometrisch bestimmt wurde.

2.2.18 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Mit einem EMSA kann man Protein-DNA-Bindungen nachweisen. Die Detektion erfolgt mittels Biotin-markierter Oligonukleotide (Heiß-Probe) (Abb.7), die die Sequenz des zu testenden regulatorischen Elements beinhaltet. Ein in den nukleären Extrakten enthaltener Transkriptionsfaktor kann nun an die Heiß-Probe binden. Diese Biotin-markierten Oligonukleotid-Protein-Komplexe werden danach mittels eines nicht-denaturierenden Polyacrylamidgels aufgetrennt und ergeben letztlich nach Entwicklung eines lichtsensitiven Films eine oder mehrere Banden (Shift). Um die Spezifität der DNA-Protein-Bindung zu überprüfen, inkubiert man in sogenannten Kompetitionsversuchen die nukleären Extrakte zunächst mit einem Oligonukleotid gleicher Sequenz, aber ohne Biotin-Markierung (Kalt-Probe) (Abb.7). Außerdem gibt

man die Kalt-Probe in der 200-fachen Menge im Vergleich zur Heiß-Probe zum Protein. Ein Transkriptionsfaktor kann nun an das DNA-Bindeelement der Kalt-Probe binden. Nach einer Inkubationszeit von 10-15 min gibt man zusätzlich die Heiß-Probe hinzu. Sofern die Bindung des Transkriptionsfaktors an das zu testende regulatorische Element der Kalt-Probe spezifisch ist, bleibt diese bestehen und weniger Protein steht zur Bindung an die Heiß-Probe zur Verfügung. Das resultiert dann letztlich in einer Abschwächung/Auslöschung des Shifts im Vergleich zum Shift der Heiß-Probe ohne vorherige Behandlung mit der Kalt-Probe. Sollte die Bindung des Transkriptionsfaktors nicht spezifisch sein, würde die Bindung an die DNA locker sein und sich immer wieder kurzzeitig auflösen, so dass die Heiß-Probe binden kann und somit der Shift nicht abgeschwächt wäre. Um zu überprüfen, ob es sich wirklich um einen bestimmten Transkriptionsfaktor handelt, der an das Oligonukleotid bindet, fügt man dem Ansatz mit den nukleären Extrakten und der Heiß-Probe zusätzlich einen für den Transkriptionsfaktor spezifischen Antikörper hinzu. Der sich bildende DNA-Transkriptionsfaktor-Antikörper-Komplex wandert im Gel langsamer und wird so als Bande oberhalb des Shifts des DNA-Transkriptionsfaktor-Komplexes sichtbar (Supershift) (Abb.7).

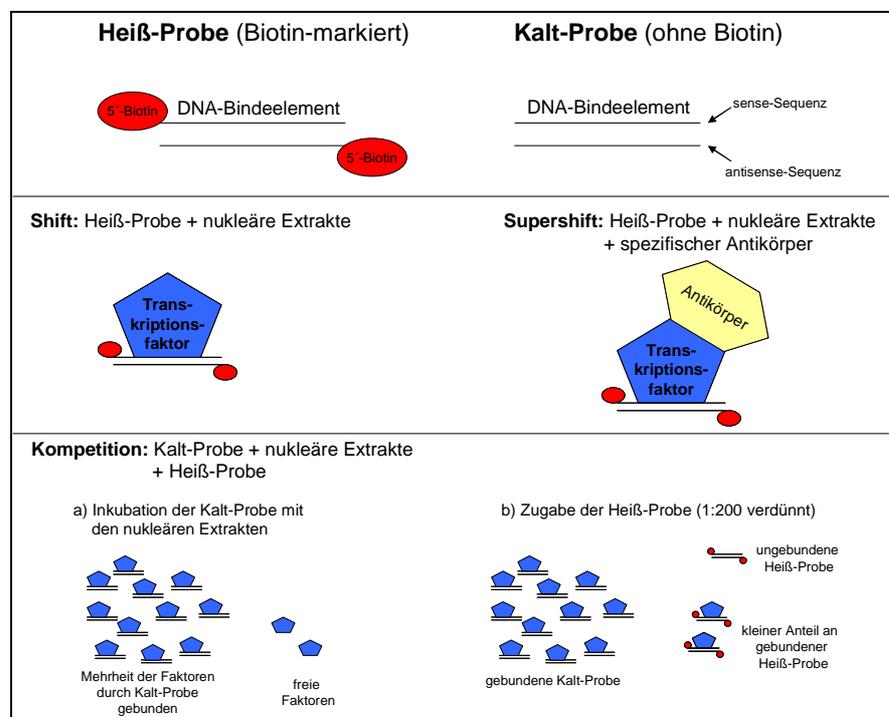


Abb.7: Schematische Darstellung des Prinzips des EMSAs.

Annealing der Heiß- und Kaltproben:

Zunächst mussten die Sense- und Antisense-Oligonukleotide annealt werden, damit sich ein doppelsträngiges DNA-Bindeelement ergab. Dazu wurden je 20 µg der Sense- und Antisense-Sequenz der zu annealenden Kalt- oder Heißprobe zusammen mit dem 10x Annealing-Puffer in einem Gesamtvolumen von 100 µl für 5 min bei 75 °C in einem Heizblock inkubiert. Danach erfolgte eine Herunterkühlung auf 37 °C und eine weitere Inkubation über Nacht. Nach einer Ethanol-fällung wurden die Proben zentrifugiert (13000 rpm, 15 min, Raumtemperatur). Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (13000 rpm, 5 min, Raumtemperatur), getrocknet und letztlich in 50 µl H₂O aufgelöst.

Zusammensetzung des Polyacrylamidgels:

14,4 ml H₂O

1 ml 10x TBE

625 µl 80% iges Glycerol

300 µl 10% iges Ammoniumpersulfat (APS)

20 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED)

4 ml 30% ige Acrylamidstammlösung

Reaktionsansätze (Gesamtvolumen 20 µl):1. Bindung des Transkriptionsfaktors an das DNA-Bindeelement (Shift)

1 µg nukleäre Extrakte

1 µl Poly[d(I-C)]

2 µl 5x Bindepuffer für EMSA

1 µl Biotin-markierte Heiß-Probe (1:200 Verdünnung)

x µl H₂O

2. Konkurrenz durch die Kalt-Probe

1 µg nukleäre Extrakte

1 µl Kalt-Probe

1 µl Poly[d(I-C)]

2 µl 5x Bindepuffer für EMSA

1 µl Biotin-markierte Heiß-Probe (1:200 Verdünnung)

x µl H₂O

3. Bildung des Supershifts (Antikörper-Transkriptionsfaktor-Oligonukleotid-Komplex)

1 µg nukleäre Extrakte

2 µg Antikörper

1 µl Poly[d(I-C)]

2 µl 5x Bindepuffer für EMSA

1 µl Biotin-markierte Heiß-Probe (1:200 Verdünnung)

x µl H₂O

Reaktionsbedingungen:

Für die Kompetitionsversuche wurde die Kalt-Probe mit den nukleären Extrakten 10-15 min präinkubiert. Auch bei den Supershift-Ansätzen wurden die nukleären Extrakte zunächst allein mit dem Antikörper inkubiert (15 min Raumtemperatur, danach 15 min auf Eis). Zu allen Ansätzen wurde Wasser, Poly[d(I-C)] und Bindepuffer gegeben und jeder Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe der 200-fach verdünnten Heiß-Probe erfolgte erneut eine Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur und 15 min auf Eis. Danach wurden alle Proben mit 1 µl Ladepuffer versetzt und das Polyacrylamidgel damit beladen. Nach 2 – 2,5 h Elektrophorese bei 120 V wurde das Gel auf eine Biotinylated Membran (BioLynx[®] B Membran) geblottet und die DNA-Protein-Komplexe mit Hilfe eines Crosslinkers fest an die Membran geknüpft. Für die Entwicklung des EMSA's wurde das Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module Kit verwendet. Es basiert auf der Streptavidin-Biotin-Methode, wobei an das Streptavidin eine Horse Radish Peroxidase (HRP) gekoppelt ist. Diese setzt ein Substrat (Luminol) um, wodurch Licht emittiert wird, das auf einem lichtsensitiven Film sichtbar gemacht werden kann. Die Entwicklung der Filme erfolgte durch eine Entwicklermaschine.

2.2.19 Herstellung von Mikrosomen

Die Mikrosomen wurden aus HepG2-, CaCo2- und KYSE70-Zellen hergestellt. Dazu wurden die Zellen mittels Akkutase abgelöst, zentrifugiert (800 rpm, 5 min, 20 °C) und das Pellet mit 10 ml PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (800 rpm, 5 min, 20°C) wurde das Pellet in 2 ml UGT-Puffer resuspendiert, in einen Potter-Elvehjem überführt und mit 10 Auf- und Abbewegungen homogenisiert. Das Homogenisat wurde

auf zwei Reaktionsgefäße verteilt und 10 min bei 2000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden erneut zentrifugiert (10000 x g, 10 min, 4 °C) und die daraus resultierenden Überstände in Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Die Pellets wurden noch einmal in 1 ml UGT-Puffer resuspendiert und zentrifugiert (10000 x g, 10 min, 4 °C). Nach Überführen der Überstände in Ultrazentrifugenröhrchen wurden sie in der Ultrazentrifuge für 60 min bei 100000 x g und 4 °C zentrifugiert. Jedes Pellet wurde in 500 µl UGT-Puffer resuspendiert und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode (Bio-Rad Protein-Assay-Lösung) photometrisch bestimmt.

2.2.20 Western Blot

Die Methode des Western Blots diente zum Nachweis und zur relativen Quantifizierung von Proteinen. Für die Gewinnung von Protein aus eukaryotischen Tumorzellen wurden die gewünschten, zum Teil mit verschiedenen Substanzen induzierten Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und mit 2-4 ml Akkutase abgelöst. Nach Zugabe von 5 ml Medium wurden die Zellen in Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, 4 °C). Das Pellet wurde mit 10 ml PBS gewaschen und erneut unter selben Bedingungen zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet in 50-100 µl PBS aufgenommen. Die Zellen wurden dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und wieder aufgetaut, damit die Zellen aufgebrochen und das Protein freigegeben wurde. Die Konzentration des gewonnenen Proteins wurde mittels Bradford-Assay photometrisch bestimmt. 20 µg pro Ansatz wurden mit 2x Lämmli-Puffer versetzt, 10 min im Wasserbad gekocht und nach kurzer Inkubation auf Eis auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen.

Zusammensetzung des denaturierenden Polyacrylamidgels:

Sammelgel (4%):

4,5 ml Sammelgelpuffer

11 ml H₂O

2,4 ml 30% ige Acrylamidstammlösung

24 µl TEMED

36 µl APS (25%)

Trenngel (10%):

4 ml Trenngelpuffer

6,7 ml H₂O

5,3 ml 30% ige Acrylamidstammlösung

8 µl TEMED

33 µl APS (25%)

Die Elektrophorese wurde bei 15-30 mA für 2-3 Stunden in SDS-Laufpuffer durchgeführt. Danach wurde das im Gel aufgetrennte Protein durch den Blotting-Prozess auf eine Nitrocellulose Membran transferiert, die danach mit ca. 5-10 ml 10% Trockenmilch bedeckt wurde, um alle freien spezifischen und unspezifischen Bindungsstellen abzudecken. Das Blocken erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung zwischen 1:200 und 1:500 in 10% Trockenmilch über Nacht bei 4 °C auf die Membran gegeben. Dieser bindet an das für ihn spezifische Protein und verdrängt dabei das blockierende Protein. Am nächsten Morgen wurde der Blot dreimal mit PBS-T gewaschen und so der überschüssige und unspezifisch gebundene Antikörper abgewaschen. Nach dem Waschen wurde der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper in Verdünnungen zwischen 1:500 bis 1:5000 für 1-2 h bei Raumtemperatur mit dem Blot inkubiert. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde das Pierce[®] ECL Western Blotting Substrat Kit verwendet, dessen zwei Lösungen in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und für 1 min auf der Membran inkubiert wurden. Dabei setzt die HRP das Substrat um, wodurch ein lichtemittierendes Produkt entsteht (Chemilumineszenz), das wiederum auf einem lichtsensitiven Film sichtbar gemacht werden kann. Die Entwicklung der Filme erfolgte durch eine Entwicklermaschine.

2.2.21 Behandlung der humanisierten transgenen *UGT1A-WT*-Mäuse mit Kaffee

Sechs weiblichen und sechs männlichen humanisierten *tgUGT1A-WT*-Mäusen wurde die in unter 2.1.12 beschriebene Kaffee-Stammlösung für 72 h anstelle von Wasser als Trinkquelle angeboten. Die Kontrollgruppe bestand aus drei Pools mit je vier *tgUGT1A-WT*-Mäusen (pro Gruppe folglich 12 männliche oder 12 weibliche Mäuse), die Wasser getrunken haben. Weiterhin wurden je vier männliche und vier weibliche

nicht transgene C57BL/6J-Mäuse mit Kaffee behandelt, um auszuschließen, dass man mit der TaqMan PCR auch murine UGT1A-mRNA detektiert. Nach 72 h wurden die Mäuse getötet, Organe isoliert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80 °C aufbewahrt. Die Tierversuche wurden vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt.

2.2.22 Biostatistik

Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe des Student's t-Test für den Vergleich verschiedener Gruppen. Unterschiede wurden als signifikant bezeichnet sofern der p-Wert kleiner als 0,05 war. Als Vergleichsgruppe dienten je nach Versuch verschiedene Werte, daher werden sie an entsprechender Stelle in den Abbildungsbeschriftungen deklariert.

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung potentieller Polymorphismen in der 5'-upstream Sequenz von *UGT1A10*

Um zu untersuchen, ob SNPs in der 5'-upstream-Region von *UGT1A10* existieren, wurden die ersten 1000 bp der *UGT1A10*-upstream-Sequenz von 52 gesunden kaukasischen Blutspendern (45 männlich, 7 weiblich) und von 24 HCC-Patienten (21 männlich, 3 weiblich) sequenziert und mit der Wildtyp-Referenzsequenz verglichen. In keiner der 76 getesteten Personen konnte ein Polymorphismus identifiziert werden.

3.2 Charakterisierung der transkriptionellen Regulation von *UGT1A8*, *UGT1A9* und *UGT1A10* durch die Transkriptionsfaktoren AhR und Nrf2

3.2.1 Zeitabhängige Induktion der humanen *UGT1A10*-mRNA und eines *UGT1A10*-Reportergenkonstruktes durch TCDD (AhR) und *t*BHQ (Nrf2)

Zunächst sollte bestimmt werden, ob und nach welcher Inkubationszeit *UGT1A10* durch TCDD und *t*BHQ induzierbar ist. Dazu wurden KYSE70-Zellen für verschiedene Zeitspannen (3 h, 6 h, 18 h, 24 h, 48 h) mit 5 nM TCDD, 100 µM *t*BHQ oder DMSO (Lösungsmittel) behandelt. Die aus den Zellen gewonnene Menge an *UGT1A10*-mRNA wurde mittels Duplex-RT-PCR bestimmt, wobei die Actin-PCR als Kontrolle für die Menge der eingesetzten cDNA diente. Abb.8 zeigt, dass DMSO die Menge der *UGT1A10*-mRNA in der Zelle nicht beeinflusst. Dahingegen wurde ab einer Inkubationszeit von 3 h eine deutliche Induktion der *UGT1A10*-mRNA durch TCDD beobachtet, und die maximale TCDD-Induzierbarkeit wurde nach 48 h erreicht. Durch eine Behandlung mit *t*BHQ wurde die *UGT1A10*-mRNA nach einer Inkubationzeit von 24 h heraufreguliert, was auch gleichzeitig den Zeitpunkt der maximalen Induktion darstellte.

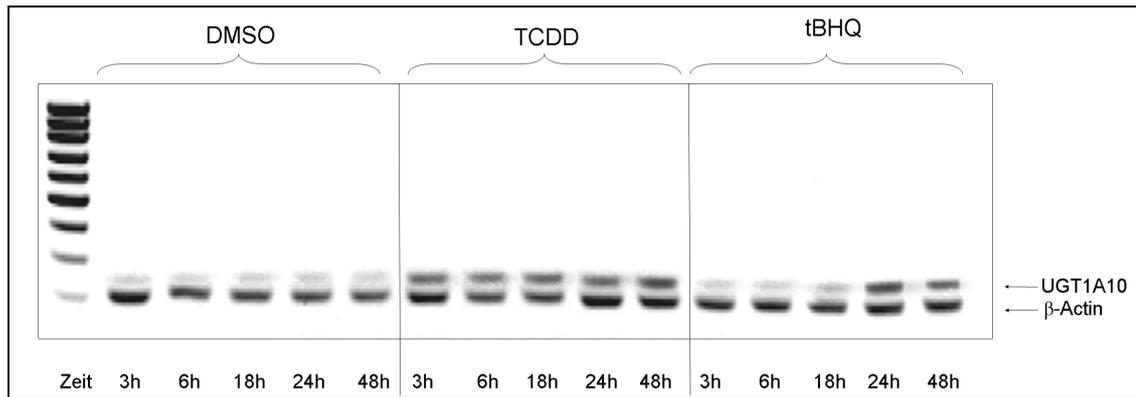


Abb.8: Zeitabhängige Regulation der *UGT1A10*-mRNA durch TCDD (5 nM) und *t*BHQ (100 μ M) im Vergleich zu DMSO in KYSE70-Zellen. Die stärkste Induktion der *UGT1A10*-mRNA durch TCDD konnte nach 48 h, durch *t*BHQ nach 24 h detektiert werden.

Für die Durchführung von Luciferase-Assays wurde ein *UGT1A10*-Reportergenkonstrukt hergestellt, das die ersten 500 bp der *UGT1A10*-5'-upstream Sequenz enthielt. Die Messung der *UGT1A10*-kontrollierten Luciferase-Aktivität ergab bei Behandlung mit TCDD oder *t*BHQ auch eine zeitabhängige Induktion des Konstruktes. Eine maximale Induzierbarkeit der Luciferase-Aktivität durch TCDD und *t*BHQ wurde jeweils nach 48 h Inkubationszeit detektiert (Abb.9). Dabei wurde das *UGT1A10*-Reportergenkonstrukt durch die Behandlung mit TCDD 6,7-fach und mit *t*BHQ 2,3-fach im Vergleich zur DMSO-Kontrolle induziert. Da TCDD den Transkriptionsfaktor AhR und *t*BHQ den Transkriptionsfaktor Nrf2 aktiviert, wurde vermutet, dass der *UGT1A10*-Promotor durch die beiden Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Für eine Spezifizierung dieser Hypothese wurde die Sequenz des *UGT1A10*-Promotors auf potentielle XRE- und ARE-Bindungsstellen untersucht.

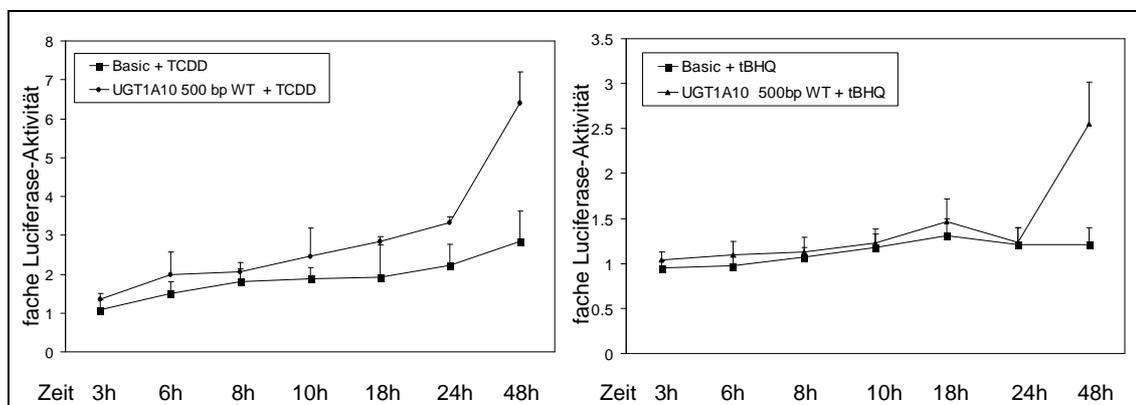


Abb.9: Zeitabhängige Regulation der *UGT1A10*-500bp-Promotorregion durch TCDD und *t*BHQ im Luciferase-Assay in KYSE70-Zellen. Eine maximale Heraufregulierung der Luciferase-Aktivität wurde sowohl durch TCDD als auch durch *t*BHQ nach 48 h beobachtet.

3.2.2 Identifizierung von XRE- und ARE-Bindungsstellen in der 5'-upstream Sequenz von *UGT1A10*

Eine potentielle ARE- und vier potentielle XRE-Bindungsstellen wurden innerhalb der ersten 500 bp 5'-upstream Sequenz von *UGT1A10* gefunden, die den entsprechenden Konsensus-Sequenzen sehr ähnlich waren (XRE-101, XRE-136, XRE-176, XRE-256 und ARE-149). Um die Funktionalität der Bindungsstellen zu testen, wurden alle Elemente einzeln mutagenisiert und die Auswirkung auf die *UGT1A10*-Induzierbarkeit durch TCDD und *t*BHQ im Luciferase-Assay untersucht. Die Messung der Luciferase-Aktivität der einzelnen mutagenisierten *UGT1A10*-Konstrukte ergab, dass eine Mutagenese von XRE-176 und XRE-256 keinen signifikanten Einfluss auf die TCDD- und *t*BHQ-Induzierbarkeit hatte (Abb.10).

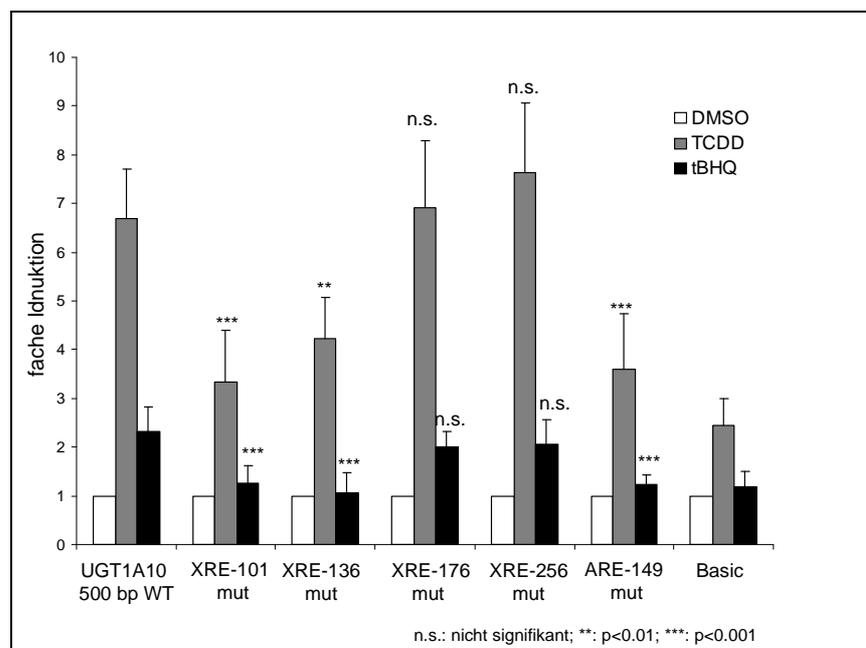


Abb.10: Luciferase-Reportergen-Assay mit dem *UGT1A10*-Wildtyp-Promotor-Konstrukt und Konstrukten mit verschiedenen mutagenisierten potentiellen XRE- und ARE-Bindestellen. Signifikanzen wurden im Vergleich zum *UGT1A10*-Wildtyp-Konstrukt bestimmt. WT: Wildtyp; mut: mutiert.

Dahingegen resultierte eine Mutagenese der XRE-101-Sequenz interessanterweise in einer signifikanten, gleichzeitigen Reduktion der TCDD- und *t*BHQ-Induzierbarkeit des *UGT1A10*-Konstruktes. Eine gleichzeitige Abnahme beider Induktionen konnte auch bei Mutation des XRE-136- und des ARE-149-Bindungselementes beobachtet werden. Eine gleichzeitige Abschwächung der TCDD- und *t*BHQ-Induktion durch

Mutagenese einer einzelnen Bindungsstelle wurde ursprünglich nicht erwartet, da das AhR-aktivierende TCDD nur einen Einfluss auf XRE- und das Nrf2-aktivierende *t*BHQ nur einen Einfluss auf ARE-Bindungsstellen haben sollte. Die hier festgestellte Abhängigkeit der TCDD und *t*BHQ vermittelten *UGT1A10*-Induktion von einzelnen DNA-Bindungsstellen ließ vermuten, dass es bei der Regulation des *UGT1A10*-Promotors offenbar zu einem Zusammenspiel zwischen dem AhR- und dem Nrf2-Pathway kommt. Um zu untersuchen, ob dieses Zusammenspiel spezifisch für *UGT1A10* ist oder auch bei anderen Genen innerhalb des hoch homologen *UGT1A7-10* Genclusters existiert, wurden auch die Gene *UGT1A8* und *UGT1A9* auf TCDD- und *t*BHQ-Induzierbarkeit getestet.

3.2.3 TCDD- und *t*BHQ-Induzierbarkeit der hoch homologen *UGT1A8*- und *UGT1A9*-Gene und Identifizierung der vermittelnden XRE- und ARE-Bindungsstellen

Trotz einer Promotorsequenz-Homologie von mehr als 75% wird *UGT1A9* vorwiegend in Leber und Nieren exprimiert, während *UGT1A8* und *UGT1A10* ausschließlich im extrahepatischen Gastrointestinaltrakt exprimiert werden. Für die Durchführung von Luciferase-Assays wurde ein *UGT1A8*-Reportergenkonstrukt hergestellt, das die ersten 500 bp der 5'-upstream Sequenz von *UGT1A8* enthielt. Das hergestellte *UGT1A9*-Konstrukt enthielt die ersten 530 bp des humanen *UGT1A9*-Promotors. Im Luciferase-Assay zeigte das *UGT1A8*-Konstrukt eine ähnliche TCDD- und *t*BHQ-Induzierbarkeit wie *UGT1A10* (Abb.11). Es wurde eine 6,4-fache Induktion durch TCDD und eine 2,7-fache durch *t*BHQ gemessen. Im Gegensatz dazu wurde *UGT1A9* lediglich 4,2-fach durch TCDD und gar nicht durch *t*BHQ induziert. Wenn man die Promotor-Sequenzen der drei homologen Gene vergleicht, zeigt sich, dass das XRE-101-Bindungsselement bei allen drei Genen identisch ist (Abb.12). Die ARE-149-Bindungsstelle, die sich bei *UGT1A9* an Position -143 befindet, ist allerdings nur bei *UGT1A8* und *UGT1A10* identisch. Bei *UGT1A9* befindet sich an Position -137 innerhalb der ARE-Sequenz ein „G“ (Guanin) anstelle des bei *UGT1A8* und *UGT1A10* vorhandenen „T“ (Thymin), womit die *UGT1A9*-ARE-Sequenz der Konsensus-Sequenz (GCNNNGTCA) ähnlicher ist.

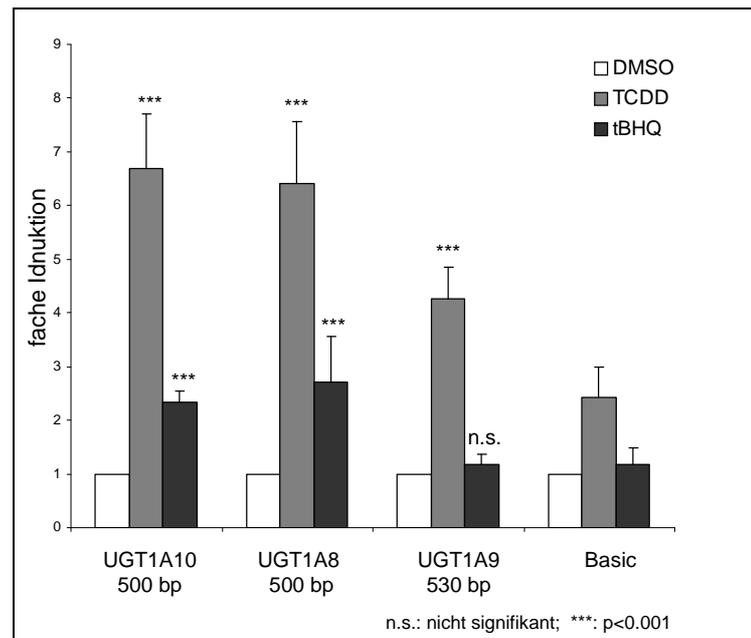


Abb.11: Vergleich der *UGT1A8*-, *UGT1A9*- und *UGT1A10*-Induzierbarkeit durch TCDD und *tBHQ* im Luciferase-Assay. Signifikanzen beziehen sich auf die Induzierbarkeit des Basic-Vektors.

Außerdem unterscheidet sich die direkt umgebende Sequenz der *UGT1A9*-ARE-Bindungsstelle in weiteren drei Basenpaaren von der der *UGT1A8*- und *UGT1A10*-Promotoren (Abb.12). Trotz der größeren Ähnlichkeit der *UGT1A9*-ARE-Sequenz mit der Konsensus-Sequenz findet bei dem *UGT1A9*-Gen im Gegensatz zu den sehr homologen *UGT1A8*- und *UGT1A10*-Genen interessanterweise keine *tBHQ* vermittelte Induktion statt.

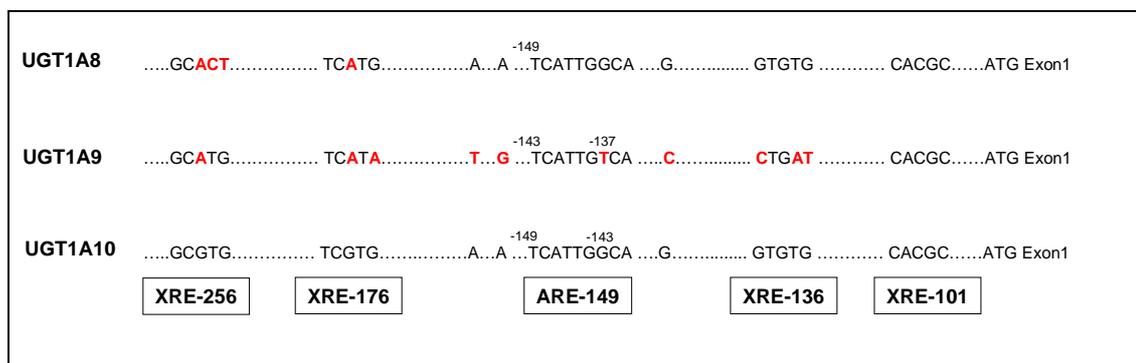


Abb.12: Vergleich der 5'-upstream Sequenzen der *UGT1A8*-, *UGT1A9*- und *UGT1A10*-Gene. Unterschiede zur *UGT1A10*-5'-upstream Sequenz sind in rot dargestellt. XRE-Konsensus-Sequenz: GCGTG (revers komplementär: CACGC); ARE-Konsensus-Sequenz: GCNNNGTCA.

Die den *UGT1A10* entsprechenden XRE-101- und ARE-149-Bindungsstellen wurden in den *UGT1A8*- und *UGT1A9*-Reporterengenkonstrukten einzeln mutagenisiert und der Einfluss der Mutagenese auf die TCDD- und *t*BHQ-Induzierbarkeit in Luciferase-Assays überprüft. Eine Mutation eines einzelnen Bindungselementes (entweder XRE-101 oder ARE-149) im *UGT1A8*-Promotor führte wie im Fall von *UGT1A10* zu einer starken und gleichzeitigen Reduktion der TCDD und *t*BHQ vermittelten Induktion (Abb.13). Durch eine gleichzeitige Mutagenese von XRE-101 und ARE-149 konnte im Vergleich zur separaten Mutation von XRE-101 keine weitere Reduktion der TCDD- und *t*BHQ-Induzierbarkeit erzielt werden.

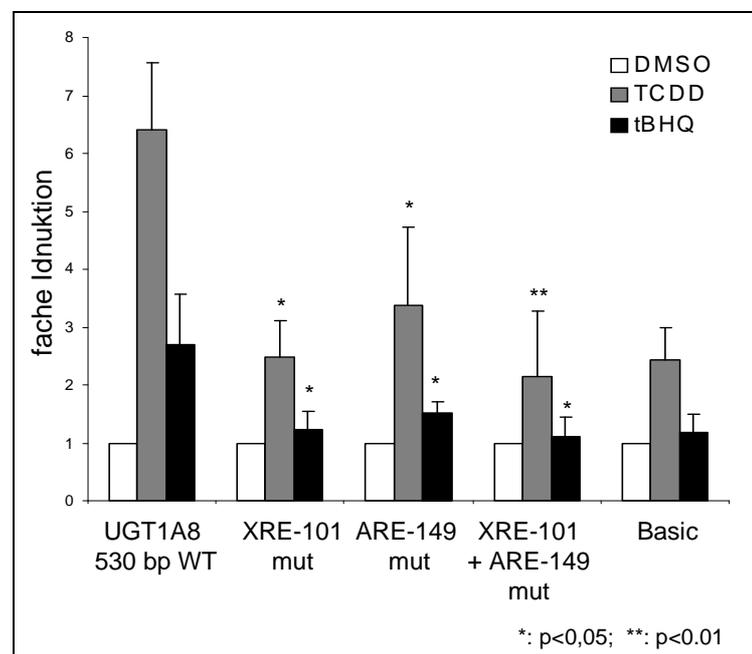


Abb.13: Einfluss der Mutagenese von XRE- und ARE-Bindestellen im *UGT1A8*-Promotor auf die TCDD- und *t*BHQ-Induktion. Signifikanzen wurden im Vergleich zum *UGT1A8*-Wildtyp-Konstrukt berechnet.

Dazu im Gegensatz beeinflusste die Mutation von ARE-143 im *UGT1A9*-Promotor die TCDD-Induzierbarkeit des Konstruktes nicht, wenngleich die Mutation der XRE-101-Sequenz zu einer signifikanten Abschwächung der TCDD-Induktion führte (Abb.14). Die Reduktion der TCDD-induzierten Luciferaseaktivität durch eine gleichzeitige Mutation von XRE-101 und ARE-143 war vergleichbar mit der, die sich durch eine separate Mutagenese von XRE-101 ergab. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die intestinal exprimierten *UGT1A8*- und *UGT1A10*-Gene koordiniert durch AhR und Nrf2 reguliert werden, während das hepatisch exprimierte *UGT1A9*-Gen zum einen nicht

durch *t*BHQ heraufreguliert werden kann und zum anderen die TCDD vermittelte Induktion nicht wie im Fall von *UGT1A8* und *UGT1A10* vom Vorhandensein der ARE-Bindungsstelle abhängig ist.

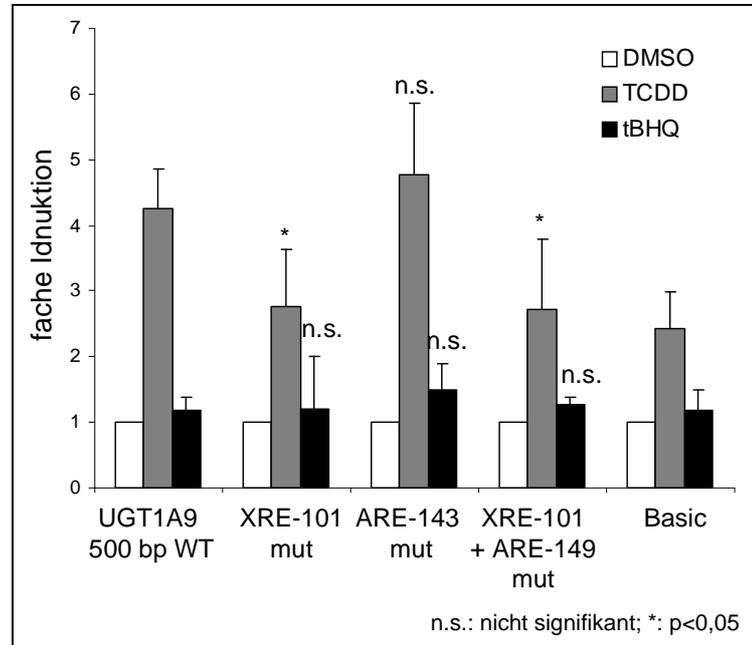


Abb.14: Einfluss der Mutagenese von XRE- und ARE-Bindestellen im *UGT1A9*-Promotor auf die TCDD- und *t*BHQ-Induktion. Signifikanzen sind im Vergleich zum *UGT1A9*-Wildtyp-Konstrukt berechnet.

3.2.4 Eine gleichzeitige Behandlung des *UGT1A10*-Reportergenkonstruktes mit TCDD und *t*BHQ führt zu keinem synergetischen Effekt

Da es in der Regulation von *UGT1A10* offenbar ein Zusammenspiel zwischen dem AhR- und dem Nrf2-Pathway gibt, sollte nun untersucht werden, ob eine gleichzeitige Behandlung der Zellen mit TCDD und *t*BHQ zu einem synergetischen Effekt führt. Dazu wurden KYSE70-Zellen innerhalb eines Luciferase-Assays gleichzeitig mit 5 nM TCDD und 100 μ M *t*BHQ für 48 h inkubiert. Die Luciferase-Aktivität in den Zellen, die gleichzeitig mit beiden Substanzen behandelt wurden, war aber nicht höher als die in den Zellen, die ausschließlich mit TCDD behandelt wurden (Abb.15). Demnach konnte kein synergetischer Effekt durch gleichzeitige Behandlung mit TCDD und *t*BHQ erzielt werden.

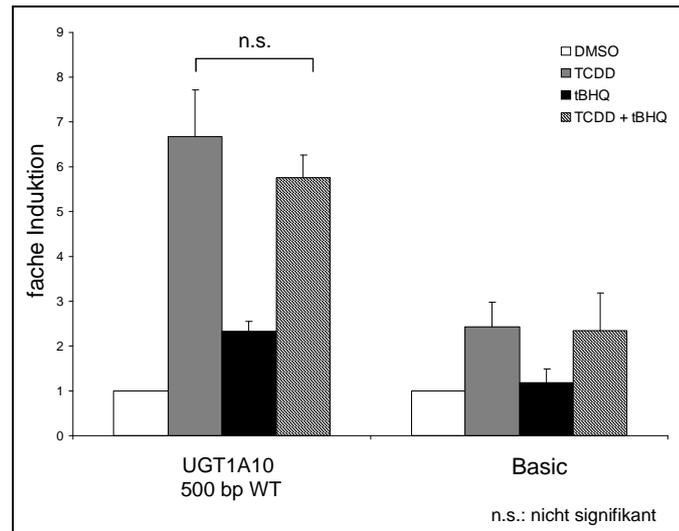


Abb.15: Eine gleichzeitige Induktion des *UGT1A10*-Reportergenkonstruktes mit TCDD und *tBHQ* im Luciferase-Assay führte zu keinem synergetischen Effekt in KYSE70-Zellen.

3.2.5 Einfluss einer Mutagenese der *UGT1A10*-ARE-149-Bindestelle entsprechend der *UGT1A9*-ARE-143-Sequenz auf die TCDD- und *tBHQ*-Induzierbarkeit

Die *UGT1A9*-ARE-143-Bindungsstelle differiert von den ARE-Sequenzen in den *UGT1A8*- und *UGT1A10*-Promotoren bezüglich eines einzigen Basenpaares direkt innerhalb der Bindungsstelle und in drei Basenpaaren, die in der umgebenden Sequenz lokalisiert sind (Abb.12). Um zu testen, welchen Effekt eine Umwandlung der ARE-Sequenz von *UGT1A10* in die der *UGT1A9*-ARE-143-Sequenz hat, wurde ein *UGT1A10*-Konstrukt hergestellt, in dem das „G“ an Position -143 im ARE zu einem „T“ entsprechend der *UGT1A9*-ARE Sequenz mutagenisiert wurde. Im Luciferase-Assay zeigte dieses Konstrukt eine vergleichbar starke Reduktion der TCDD und *tBHQ* vermittelten *UGT1A10*-Induktion wie das Konstrukt, in dem die ARE-149-Sequenz komplett durch eine nonsense-Sequenz ersetzt wurde (Abb.16 A). Wurden zusätzlich auch die differierenden Basenpaare in der umliegenden Sequenz von *UGT1A10*-ARE-149 entsprechend der *UGT1A9*-Sequenz mutagenisiert (Konstrukt ARE-149 mut like 1A9 „all“), ergab sich keine stärkere Abschwächung der TCDD- und *tBHQ*-Induktion im Vergleich zu dem Konstrukt, in dem nur das eine Basenpaar direkt innerhalb der ARE-Sequenz mutiert war. Demnach entscheidet das Vorhandensein der Guaninbase innerhalb der ARE-Sequenz im *UGT1A10*-Promoter

über die Funktion der *t*BHQ-Induzierbarkeit und gleichzeitig darüber, ob der Promotor durch TCDD induzierbar ist, da der Austausch der Guaninbase durch eine Thyminbase ebenso zu einer signifikanten Reduktion der TCDD vermittelten Induktion führt. Auch diese Ergebnisse sprechen für eine koordinierte Regulation des *UGT1A10*-Promotors durch AhR und Nrf2.

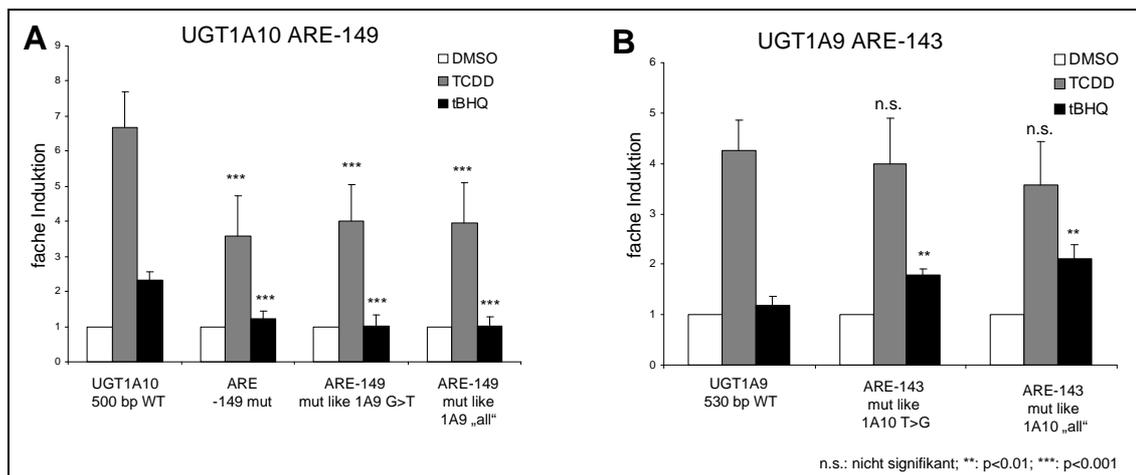


Abb.16: A: Einfluss der Mutagenese der *UGT1A10*-ARE-Sequenz entsprechend der *UGT1A9*-ARE-Sequenz auf die TCDD- und *t*BHQ-Induktion. B: Einfluss der Mutagenese der *UGT1A9*-ARE-Sequenz entsprechend der *UGT1A10*-ARE-Sequenz auf die TCDD und *t*BHQ vermittelte Induktion. Signifikanzen sind auf die Induktionen der jeweiligen Wildtyp-Konstrukte bezogen.

3.2.6 Einfluss einer Mutagenese der *UGT1A9*-ARE-143-Bindestelle entsprechend der *UGT1A10*-ARE-149-Sequenz auf die TCDD- und *t*BHQ-Induzierbarkeit

Um zu untersuchen, ob eine *t*BHQ vermittelte Regulation für das *UGT1A9*-Gen künstlich herzustellen ist, wurde ein *UGT1A9*-Reportergenkonstrukt kloniert, dessen ARE-Bindungsstelle an Position -137 anstatt eines Thymins ein Guanin wie *UGT1A10* enthielt (Abb.12). Im Luciferase-Assay zeigte sich, dass dieses Konstrukt im Gegensatz zum *UGT1A9*-Wildtyp-Konstrukt immerhin 1,8-fach durch *t*BHQ induzierbar war (Abb.16 B). Wurden zusätzlich auch die drei weiteren differierenden Basenpaare in der umliegenden Sequenz des AREs von *UGT1A9* entsprechend der *UGT1A10*-Sequenz mutagenisiert (Konstrukt ARE-143 mut like 1A10 „all“), konnte die Luciferase-Aktivität dieses Konstruktes durch *t*BHQ 2,1-fach induziert werden. Die TCDD vermittelte Induktion wurde durch die ARE-Mutagenese in beiden Konstrukten nicht signifikant beeinflusst.

3.2.7 siRNA vermittelter Knockdown von AhR und Nrf2 und dessen Einfluss auf die TCDD- und *t*BHQ-Induzierbarkeit von *UGT1A8*, *UGT1A9* und *UGT1A10*

In den folgenden Experimenten wurden die Transkriptionsfaktoren AhR und Nrf2 durch spezifische siRNAs herunterreguliert, um zu zeigen, dass die genspezifische Regulation von *UGT1A8*, *UGT1A9* und *UGT1A10* direkt von AhR und Nrf2 abhängen. Die Effizienz der verwendeten siRNA wurde mittels Western Blot getestet. Dazu wurden KYSE70-Zellen mit 100 nM AhR-, Nrf2- oder Kontroll-siRNA behandelt. Die sechs Stunden darauffolgende Inkubation mit DMSO, TCDD bzw. *t*BHQ erfolgte entweder für weitere 24 h oder 48 h. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit den entsprechenden Antikörpern behandelt. Zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge wurde jeder Blot zusätzlich mit einem β -Actin-Antikörper behandelt.

Ohne Behandlung mit siRNA zeigte sich nach 24 h eine starke Zunahme der AhR-Proteinmenge durch TCDD, die nach 48 h immer noch, allerdings etwas abgeschwächerter zu detektieren war (Abb.17 A). Im Vergleich zur Behandlung mit Kontroll-siRNA führte die Behandlung mit AhR-siRNA zu einer starken Reduktion der AhR-Proteinmenge nach 24 h. Nach 48 h war kein AhR-Protein mehr detektierbar. Die Nrf2-Proteinmenge nahm nach einer Inkubationszeit von 24 h und 48 h mit *t*BHQ etwa gleich stark zu (Abb.17 B). Im Vergleich zur Behandlung mit Kontroll-siRNA resultierte die Behandlung mit Nrf2-siRNA in einer Reduktion der Nrf2-Proteinmenge.

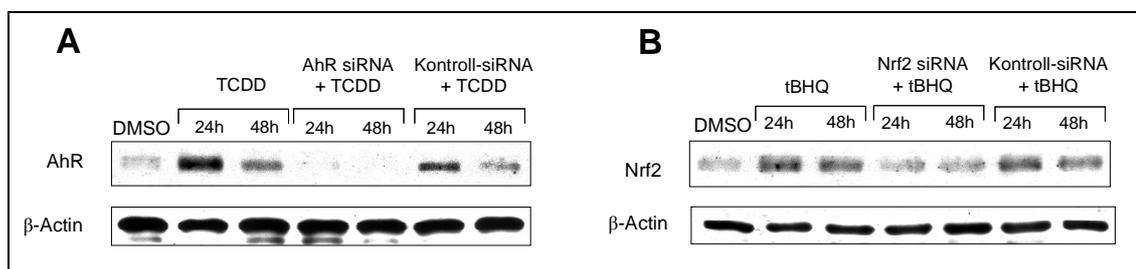


Abb.17: Überprüfung der Effizienz der verwendeten siRNA mittels Western Blot.

Um den Einfluss des AhR-/Nrf2-Knockdowns auf die *UGT1A10*-Regulation zu untersuchen, wurde aus den mit siRNA und TCDD bzw. *t*BHQ behandelten KYSE70-Zellen RNA isoliert und die Menge an *UGT1A10*-mRNA mit Hilfe einer Duplex-RT-PCR bestimmt. Der AhR-Knockdown führte im Vergleich zu der Behandlung mit Kontroll-siRNA zu einem gleichzeitigen Verlust der TCDD und *t*BHQ vermittelten

Induktion der UGT1A10-mRNA (Abb.18). Analog kam es nach Behandlung mit Nrf2-siRNA zu einem gleichzeitigen Verlust der TCDD- und *t*BHQ-Induzierbarkeit.

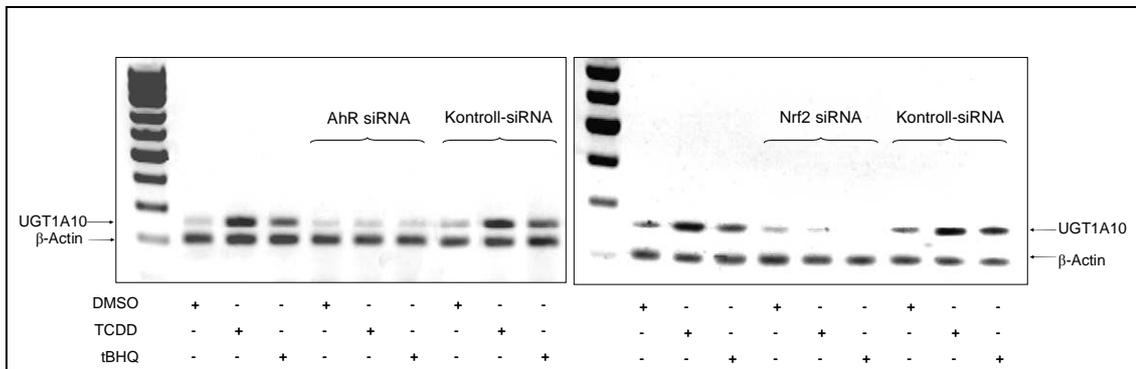


Abb.18: Einfluss des AhR-/Nrf2-Knockdowns auf die UGT1A10-mRNA-Induzierbarkeit durch TCDD und *t*BHQ.

Auch in den durchgeführten Luciferase-Assays resultierte eine separate Behandlung mit entweder AhR- oder Nrf2-siRNA in einem simultanen Verlust der TCDD und *t*BHQ vermittelten Induktion des *UGT1A10*-Reporterergenkonstruktes (Abb.19). Für das *UGT1A8*-Reporterergenkonstrukt zeigte sich in Folge des AhR- oder Nrf2-Knockdowns ebenso eine gleichzeitige signifikante Reduktion der TCDD- und *t*BHQ-Induzierbarkeit (Abb.19).

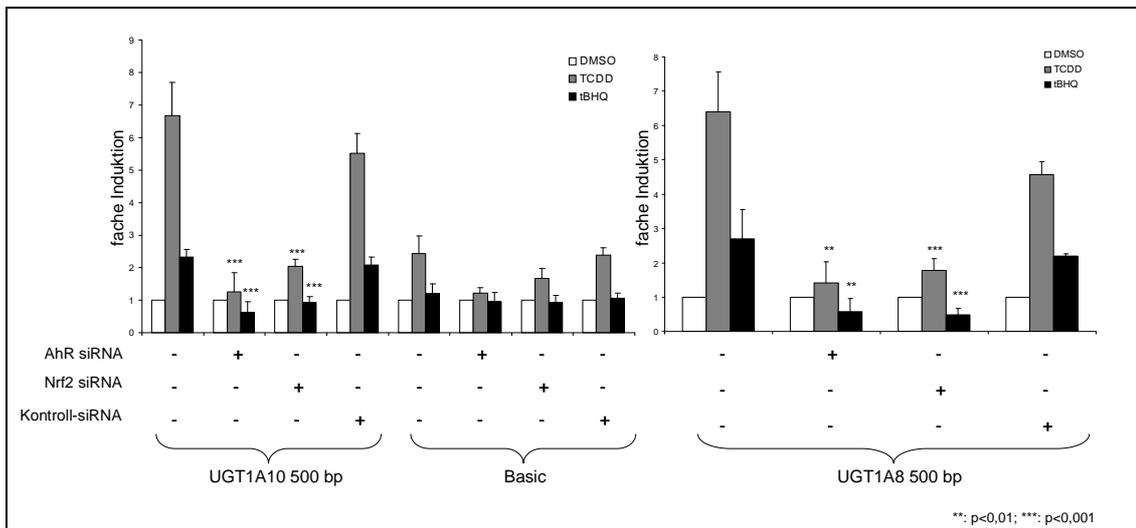


Abb.19: Einfluss des siRNA vermittelten Knockdowns von AhR/Nrf2 auf die TCDD-/*t*BHQ-Induzierbarkeit von *UGT1A10* und *UGT1A8*; Signifikanzen wurden in Bezug auf die Werte der Kontroll-siRNA berechnet.

Die Behandlung mit AhR-siRNA bei Verwendung des *UGT1A9*-Reporterergenkonstruktes führte zu einer signifikanten Reduktion der TCDD-

Induzierbarkeit (Abb.20). Weiterhin wurde *UGT1A9* bei gleichzeitiger *t*BHQ- und AhR-siRNA-Behandlung leicht inhibiert, wobei die Basicwerte bei gleichzeitiger AhR-siRNA- und *t*BHQ-Inkubation im Vergleich zur separaten *t*BHQ-Behandlung auch verringert wurden (Abb.19) und dieser Effekt daher wahrscheinlich nicht spezifisch ist. Ein Nrf2-Knockdown hatte dahingegen keinen Einfluss auf die TCDD vermittelte Induktion von *UGT1A9*. Dieses Ergebnis zeigt übereinstimmend mit den vorher beschriebenen Daten, dass die TCDD-Induzierbarkeit von *UGT1A9* im Gegensatz zu der von *UGT1A8* und *UGT1A10* nicht vom Transkriptionsfaktor Nrf2 abhängig ist. Um zu untersuchen, ob die bei *UGT1A8* und *UGT1A10* vorhandene gegenseitige Abhängigkeit der beiden Transkriptionsfaktoren AhR und Nrf2 bei der Regulation von *UGT1A9* auch künstlich hergestellt werden kann, wurde das Konstrukt ARE-143 mut like 1A10 „all“, dessen ARE-143 entsprechend der *UGT1A10* Sequenz mutagenisiert ist, in Luciferase-Assays einem AhR- bzw. Nrf2-Knockdown ausgesetzt.

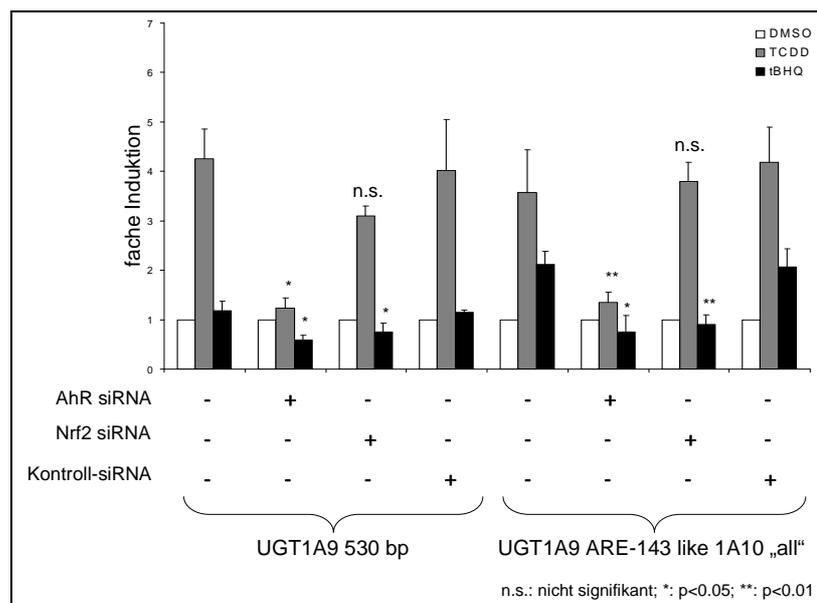


Abb.20: Einfluss des AhR-/Nrf2-Knockdowns auf die TCDD-/tBHQ-Induzierbarkeit des *UGT1A9*-WT-Konstruktes und der des Konstruktes *UGT1A9* ARE-143 mut like 1A10 „all“. Die ermittelten Signifikanzen beziehen sich auf die Kontroll-siRNA-Werte.

Wie der Abb.20 zu entnehmen ist, ging die künstlich erschaffene *t*BHQ-Induzierbarkeit des Konstruktes sowohl durch die Behandlung mit AhR- als auch durch die Behandlung mit Nrf2-siRNA vollständig verloren. Durch den AhR-Knockdown wurde auch die TCDD vermittelte *UGT1A9*-Induktion stark reduziert, wohingegen diese nicht durch die Behandlung mit Nrf2-siRNA beeinflusst werden konnte.

Zusammenfassend wird hier gezeigt, dass sowohl die TCDD als auch die *t*BHQ vermittelte Induktion von *UGT1A8* und *UGT1A10* von einer gleichzeitigen Präsenz der beiden Transkriptionsfaktoren AhR und Nrf2 abhängig ist. Im Gegensatz dazu beeinflusst die Präsenz von Nrf2 die TCDD-Induzierbarkeit des *UGT1A9*-Wildtyp-Konstruktes nicht. Auch wenn das ARE-Bindungs-element von *UGT1A9* entsprechend der *UGT1A10*-Sequenz mutiert ist, scheint die künstlich erschaffene *t*BHQ-Induzierbarkeit zwar abhängig von AhR zu sein, allerdings wird die TCDD vermittelte Induktion auch hier nicht vom Vorhandensein von Nrf2 beeinflusst.

3.2.8 Spezifität der TCDD und *t*BHQ vermittelten Induktion und die der verwendeten AhR- und Nrf2-siRNA

TCDD ist ein Ligand von AhR und ist für die Trennung von AhR von seinem Inhibitor im Cytoplasma verantwortlich. *t*BHQ ist ein Erzeuger von oxidativem Stress und eine Behandlung mit *t*BHQ führt in den Zellen dazu, dass sich Nrf2 von seinem Inhibitor Keap1 im Cytoplasma löst und in den Zellkern wandern kann. In einer Studie wurde berichtet, dass das *Nrf2*-Gen über ein im Promotor lokalisiertes XRE-Bindeelement durch AhR reguliert wird (107). Dies würde bedeuten, dass eine Behandlung der Zellen mit TCDD nicht nur in einer Aktivierung von AhR, sondern auch in einer Induktion der *Nrf2*-mRNA und letztlich in einem Ansteigen der *Nrf2*-Protein-Konzentration resultieren würde. Demnach könnte die koordinierte Regulation von *UGT1A8* und *UGT1A10* durch AhR und Nrf2 das Ergebnis eines unspezifischen Effektes von TCDD sein. Um zum einen die Spezifität der Induktionen mit TCDD und *t*BHQ und zum anderen die Spezifität der verwendeten siRNA zu untersuchen, wurden KYSE70-Zellen mit TCDD, *t*BHQ und/oder AhR- bzw. Nrf2-siRNA behandelt. Das nach einer TCDD-/*t*BHQ-Inkubationszeit von 24 h gewonnene Zelllysate wurde in einen Western Blot eingesetzt. Es konnte eine starke Zunahme des AhR-Proteins durch eine Behandlung mit TCDD detektiert werden (Abb.21). Dahingegen veränderte sich die AhR-Proteinmenge durch die Behandlung mit *t*BHQ überhaupt nicht. Außerdem wurde die TCDD vermittelte Aktivierung von AhR kaum durch die Behandlung mit Nrf2-siRNA beeinflusst. Die *Nrf2*-Proteinmenge nahm durch die Gabe von TCDD im Gegensatz zur Behandlung mit *t*BHQ nicht zu (Abb.21). Auch die Behandlung mit AhR-siRNA führte zu keiner bedeutenden Reduktion der *Nrf2*-Proteinmenge.

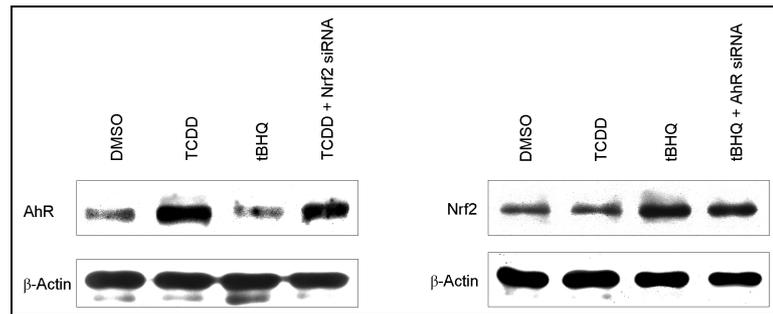


Abb.21: Untersuchung der TCDD-/tBHQ vermittelten Induktion mittels Western Blot.

Um zu untersuchen, ob TCDD oder tBHQ die Menge an AhR- bzw. Nrf2-mRNA beeinflusst, wurde aus den mit TCDD/tBHQ behandelten KYSE70-Zellen RNA gewonnen, cDNA hergestellt und eine AhR- bzw. Nrf2-spezifische PCR durchgeführt (Primer Tab.1). Die Ergebnisse zeigen, dass weder die Menge an AhR- noch die an Nrf2-mRNA durch die Behandlung mit TCDD oder tBHQ erhöht wurde (Abb.22). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass *UGT1A8* und *UGT1A10* tatsächlich koordiniert durch AhR und Nrf2 reguliert werden und die Ergebnisse keinen Effekt von unspezifischen Kreuzreaktionen innerhalb der AhR- und Nrf2-Pathways darstellen.

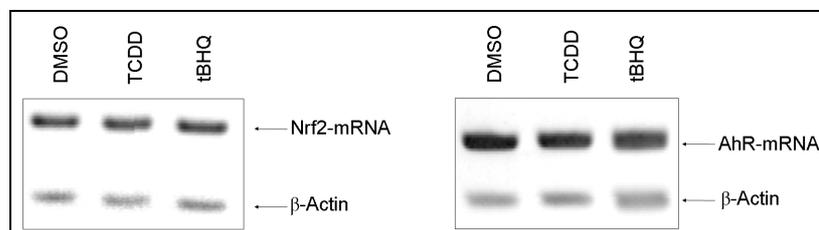


Abb.22: Untersuchung der Spezifität der TCDD/tBHQ vermittelten Induktion auf AhR-/Nrf2-mRNA-Ebene.

3.2.9 Bestätigung der Bindung von AhR und Nrf2 an die XRE- und ARE-Bindungsstellen im *UGT1A10*-Promotor mit Hilfe von Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs)

Um eine direkte Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren AhR und Nrf2 mit den XRE-101- und ARE-149-Bindungsstellen des *UGT1A10*-Promotors zu beweisen, wurden EMSAs durchgeführt. Zunächst sollte die Bindung von Transkriptionsfaktoren aus nukleären Extrakten an die *UGT1A10*-spezifischen XRE-101- und ARE-149-Sequenzen mit der Bindung von AhR bzw. Nrf2 an die entsprechenden

Konsensus-Sequenzen verglichen werden. Da man davon ausgeht, dass eine im EMSA entstandene Bande der Konsensus-Sequenz eine spezifische Bindung von Nrf2 an ARE bzw. von AhR an XRE darstellt, wäre eine Bande der *UGT1A10*-spezifischen Sequenz auf derselben Höhe der Konsensus-Bande ein Hinweis darauf, dass es sich wahrscheinlich um den gleichen gebundenen Transkriptionsfaktor handelt. Abb.23 zeigt einen EMSA für die XRE-101- und ARE-149-Bindungsstellen von *UGT1A10* unter Verwendung von nukleären Extrakten, die aus TCDD- bzw. *t*BHQ-behandelten KYSE70-Zellen gewonnen wurden. In Spur 1 in Abb.23 A ist eine Bande zu sehen, die unter Verwendung der XRE-101-Heißprobe gebildet wurde und als Shift bezeichnet wird. Auf derselben Höhe befindet sich der Shift der Konsensus-XRE-Heißprobe in Spur 2, was darauf hindeutet, dass die *UGT1A10*-XRE-101- und die XRE-Konsensus-Sequenz den gleichen Transkriptionsfaktor binden.

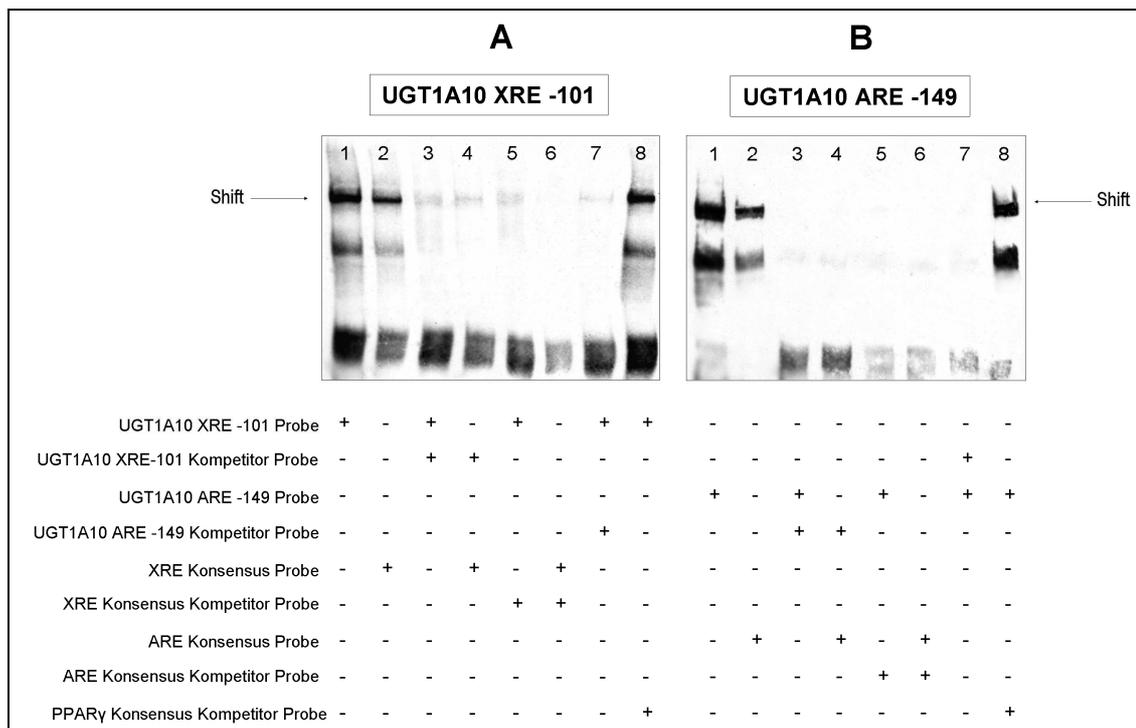


Abb.23: Wettbewerbsversuche für die *UGT1A10*-XRE-101- und ARE-149-Bindestellen im EMSA.

Der Shift der XRE-101-Probe konnte durch die XRE-101-Kalt-Probe kompetitiert werden (Spur 3), weshalb die Bindung des Transkriptionsfaktors an XRE-101 als spezifisch betrachtet werden kann. Ebenso wurden die Intensität des XRE-101-Shifts durch gleichzeitige Verwendung der Konsensus-Kaltprobe (Spur 5) und der Shift der XRE-Konsensus-Probe durch die XRE-101-Kaltprobe stark abgeschwächt (Spur 4), was einen weiteren Beweis für die Annahme liefert, dass derselbe Transkriptionsfaktor

(AhR) an die XRE-Konsensus und an die *UGT1A10*-spezifische XRE-101-Sequenz bindet. Interessanterweise wurde der XRE-101-Shift auch durch die *UGT1A10*-ARE-149-Kaltprobe kompetitiert (Spur 7), wohingegen die gleichzeitige Kontroll-Behandlung mit einer Kaltprobe, die spezifisch für den Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR γ) war, nicht in einer Abschwächung resultierte (Spur 8). Demnach bindet das Protein oder der Protein-Komplex, der an XRE-101 bindet, auch spezifisch an die ARE-149 Sequenz. Weiterhin wurde der XRE-Konsensus-Shift durch die XRE-Konsensus-Kaltprobe kompetitiert (Spur 6), was als Kontrollexperiment für die Funktionalität der gewählten Methode diente.

Ein entsprechendes Experiment mit Wettbewerbsversuchen wurde auch für die *UGT1A10*-ARE-149-Sequenz durchgeführt (Abb.23 B). Der Shift der ARE-149-Probe (Spur 1) befand sich auf derselben Höhe des Shifts der ARE-Konsensus-Probe (Spur 2) und wurde durch die Verwendung der ARE-149-Kaltprobe (Spur 3), der ARE-Konsensus-Kaltprobe (Spur 5) und der XRE-101-Kaltprobe (Spur 7) kompetitiert. Damit wurde auch für die ARE-149-Probe eine spezifische Bindung nachgewiesen und es wurden Hinweise darauf erhalten, dass es sich bei dem gebundenen Transkriptionsfaktoren wahrscheinlich um Nrf2 handelt. Weiterhin bindet das an ARE-149 gebundene Protein (oder ein Proteinkomplex) auch an die XRE-101-Sequenz. Diese Bindung scheint auch spezifisch zu sein, da eine verwendete PPAR γ -Konsensus-Kaltprobe keine Abschwächung des ARE-149-Shifts erzielen konnte (Spur 8).

Um einen direkten Beweis dafür zu erhalten, ob es sich bei den an die getesteten *UGT1A10*-Bindeelemente gebundenen Transkriptionsfaktoren tatsächlich um AhR und Nrf2 handelt, wurden in weiteren EMSAs AhR- und Nrf2-spezifische Antikörper verwendet. Bei einer vorherigen Inkubation der nukleären Extrakte mit dem AhR-Antikörper konnte unter Verwendung der XRE-101-Probe ein Komplex erzeugt werden, der im Gel aufgrund seiner größeren Größe langsamer als der Shift wandert und als Supershift bezeichnet wird (Spur 4) (Abb.24). Interessanterweise hat sich auch mit Hilfe des Nrf2-Antikörpers ein Supershift unter Verwendung der XRE-101-Probe gebildet (Spur 5), während ein unspezifisches IgG (Kaninchen anti-Ziege, HRP-Konjugat) keinen Supershift erzeugen konnte (Spur 6). Demnach binden sowohl AhR als auch Nrf2 an die *UGT1A10*-XRE-101-Bindungsstelle. Analog wurde auch bei der Verwendung der *UGT1A10*-ARE-149-Probe sowohl mit Hilfe des Nrf2- als auch des

AhR-Antikörpers ein Supershift gebildet, woraus man schließen kann, dass auch hier beide Transkriptionsfaktoren an die ARE-149-Sequenz binden.

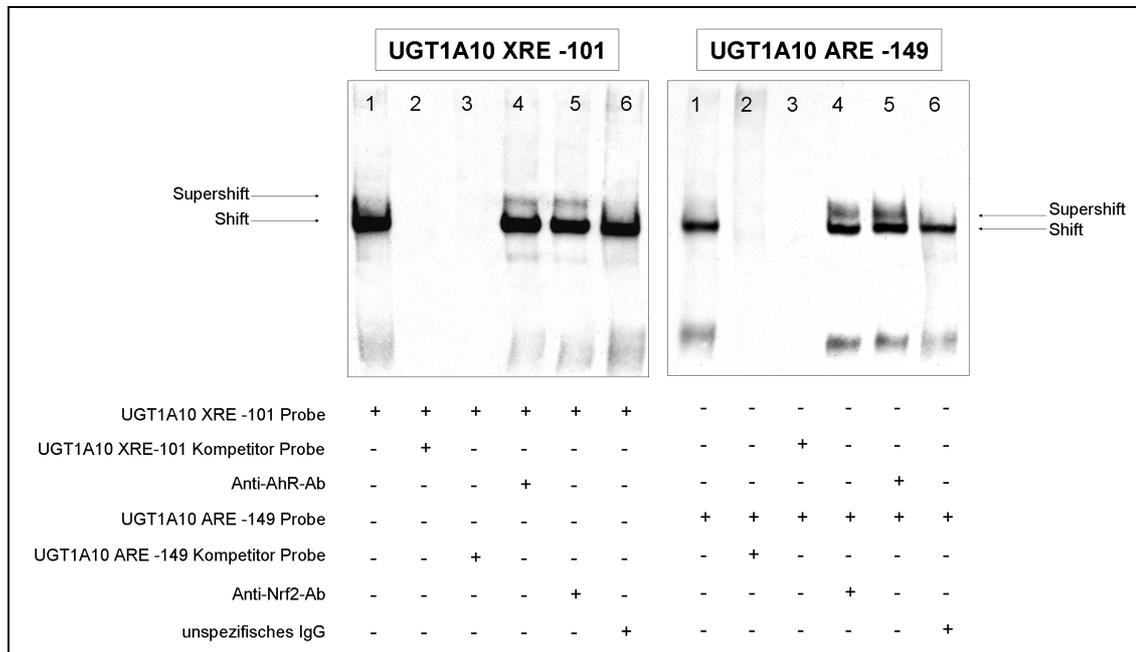


Abb.24: Supershift-Experimente für die *UGT1A10*-XRE-101- und ARE-149-Bindestellen im EMSA.

Da die *UGT1A10*-ARE-136-Bindungsstelle in den durchgeführten Luciferase-Assays ebenso wie die XRE-101- und ARE-149-Elemente bei Mutagenese eine simultane Reduktion der TCDD- und *t*BHQ-Induzierbarkeit aufwies (Abb.10), wurde auch dieses Bindeelement im EMSA getestet. Abb.25 zeigt, dass sich der Shift der XRE-136-Probe (Spur 1) auf der gleichen Höhe wie der XRE-Konsensus-Shift befindet (Spur 2) und durch die XRE-136-Kaltprobe (Spur 3), durch die XRE-Konsensus-Kaltprobe (Spur 5) und durch die ARE-149-Kaltprobe kompetitierbar war (Spur 7), während eine PPAR γ -Konsensus-Kaltprobe zu keiner Konkurrenz führte (Spur 8). Unter Verwendung der AhR- und Nrf2-Antikörper konnte im Gegensatz zum Gebrauch eines unspezifischen IgGs (Spur 6) für die XRE-136-Probe jeweils ein Supershift erzeugt werden (Spur 4 und 5).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die beiden Transkriptionsfaktoren AhR und Nrf2 an allen getesteten *UGT1A10*-Bindungselementen (XRE-101, ARE-149, XRE-136) immer gleichzeitig nachgewiesen werden konnten. Demnach scheint es eine direkte oder eine über Adapterproteine vermittelte Interaktion zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren zu geben.

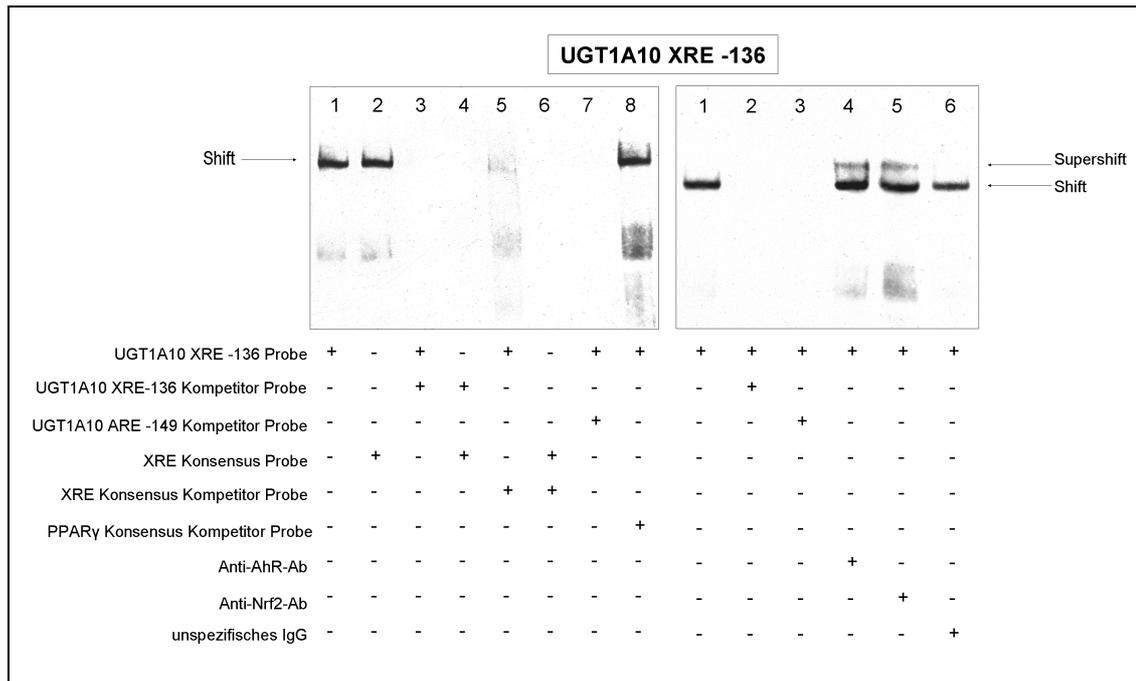


Abb.25: Kompetitions- und Supershift-Experimente für die *UGT1A10*-XRE-136-Bindestelle im EMSA.

3.3 Die Modulation der UGT1A-Expression durch Kaffee, Kakao und Tee im Zellkultursystem und in der humanisierten *tgUGT1A-WT*-Maus

3.3.1 Heraufregulierung verschiedener UGT1A-Isoformen durch Kaffee

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob UGTs durch Genussmittel wie Kaffee, Tee oder Kakao, die von einem Großteil der Bevölkerung täglich konsumiert werden, induziert werden und wie diese Induktion vermittelt wird.

In Luciferase-Assays wurden Reportergenkonstrukte, die verschiedene *UGT1A*-Promotoren enthielten, auf eine Induzierbarkeit durch koffeinhaltigen Kaffee und entkoffeinierten Kaffee getestet. Die mit den verschiedenen Konstrukten transfizierten Zellen wurden für 48 h mit einem Kaffee-Medium-Gemisch behandelt. Dieses Gemisch setzte sich aus 88% Gibco RPMI 1640 Medium und 12% einer Kaffeestammlösung zusammen. Bei der Stammlösung handelte es sich um einen Filterkaffee (entweder koffeinhaltig oder entkoffeiniert), der mit einem Löffel Kaffee pro Tasse (6 g pro 150 ml Wasser) gebrüht wurde (siehe 2.2.12). Die Ergebnisse der Luciferase-Aktivitätsmessung zeigen, dass *UGT1A1* 5,4-fach, *UGT1A3* 5,2-fach, *UGT1A4* 4,8-fach, *UGT1A7* 6,2-fach, *UGT1A8* 5,2-fach, *UGT1A9* 3,5-fach und *UGT1A10* 6,1-fach durch Kaffee induzierbar waren (Abb.26). Die Behandlung mit

entkoffeiniertem Kaffee resultierte in einer ähnlich hohen signifikanten Induktion der Luciferase-Aktivität aller getesteten *UGT1A*-Konstrukte.

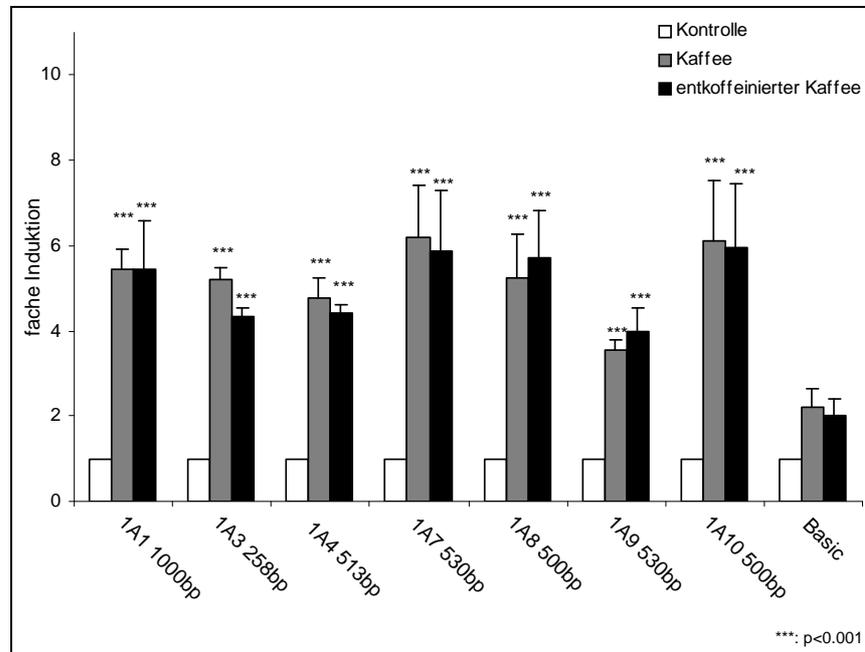


Abb.26: *UGT1A*-Induktion durch koffeinhaltigen und entkoffeinierten Kaffee im Luciferase-Assay in KYSE70-Zellen. Die ermittelten Signifikanzen beziehen sich auf den Basic-Vektor.

Um die Heraufregulierung der *UGT1A*-Isoformen auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurde ein Western Blot beispielhaft für die *UGT1A1*-Isoform durchgeführt. Als Kontrolle für die Laufhöhe dienten dazu humane Lebermikrosomen, die aus einem Stück einer humanen Leber isoliert wurden. HepG2-, CaCo2- und KYSE70-Zellen wurden für 48 h mit Wasser, Kaffee oder entkoffeiniertem Kaffee behandelt und deren Mikrosomen isoliert. Sowohl durch die Behandlung mit Kaffee als auch durch die mit entkoffeiniertem Kaffee kam es zu einer Erhöhung der *UGT1A1*-Proteinmenge in allen drei getesteten Zelllinien (Abb.27). Demnach wird zumindest *UGT1A1* in Folge der Kaffeebehandlung nicht nur im Luciferase Assay (Transkription), sondern auch auf Proteinebene heraufreguliert.

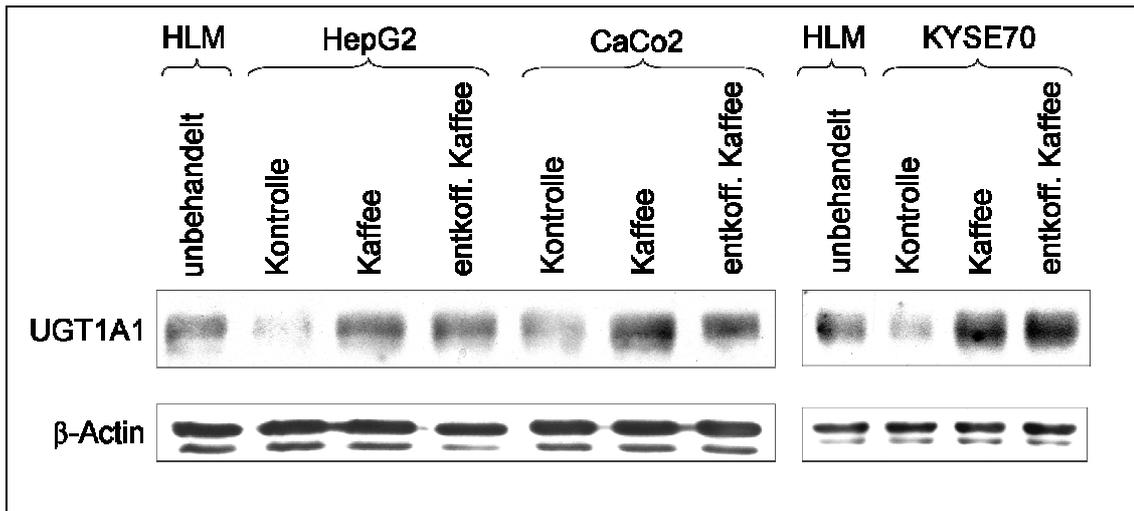


Abb.27: UGT1A1-Induktion durch Kaffee auf Protein-Level (mittels Western Blot) in Mikrosomen von HepG2-, CaCo2- und KYSE70-Zellen. Zur Kontrolle der Lauffhöhe von UGT1A1 wurden humane Lebermikrosomen (HLM) verwendet.

3.3.2 Luciferase-Assay-basierte *UGT1A*-Kaffeinduktion in HepG2- und CaCo2-Zellen

Es sollte im Weiteren untersucht werden, ob die verschiedenen *UGT1A*-Reportergenkonstrukte auch in HepG2- und CaCo2-Zellen durch verschiedene Kaffeearten induzierbar sind. Dazu wurden die *UGT1A1*-, *UGT1A7*- und *UGT1A10*-Konstrukte in die Zellen transfiziert und diese mit Kaffee, entkoffeiniertem Kaffee und Instant Kaffee behandelt. In HepG2-Zellen wurden *UGT1A1* durch Kaffee 5-fach, *UGT1A7* 4,5-fach und *UGT1A10* 4,2-fach induziert (Abb.28 A).

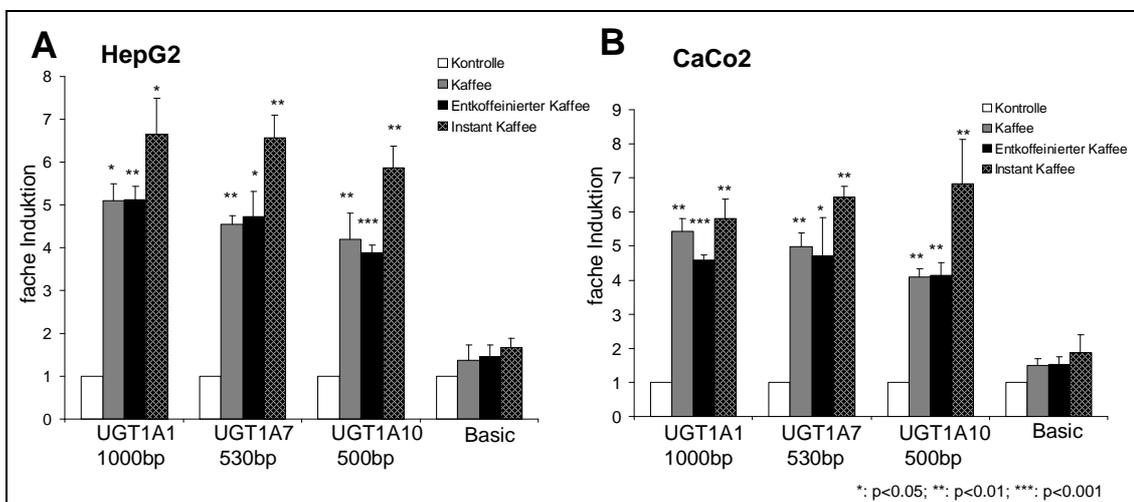


Abb.28: Kaffee vermittelte Induktion von *UGT1A1*, *UGT1A7* und *UGT1A10* in HepG2- (A) und CaCo2-Zellen (B). Signifikanzen beziehen sich auf den Basic-Vektor.

Der entkoffeinierte Kaffee führte zu einer ähnlich hohen Induktion. Eine Behandlung mit Instant Kaffee resultierte in einer Luciferase-Aktivität, die stärker war als die durch Filterkaffee induzierte Aktivität (*UGT1A1* 6,6-fach, *UGT1A7* 6,6-fach, *UGT1A10* 5,9-fach). In CaCo2-Zellen wurde eine ähnliche *UGT1A*-Induzierbarkeit durch Kaffee beobachtet (Abb.28 B). Koffeinunabhängig wurde das *UGT1A1*-Konstrukt rund 5-fach, *UGT1A7* 5,8-fach und *UGT1A10* 4,1-fach durch Filterkaffee induziert. Während die Behandlung mit Instant Kaffee bei *UGT1A1* und *UGT1A7* im Vergleich zur Behandlung mit Filterkaffee nur in einer leichten weiteren Erhöhung der Induzierbarkeit resultierte, wurde *UGT1A10* durch Instant Kaffee deutlich stärker induziert als durch Filterkaffee (6,8-fach).

3.3.3 Induktion von *UGT1A1*, *UGT1A7*, *UGT1A10* und der Genvarianten *UGT1A1*28* und *UGT1A7*12* durch verschiedene Kaffee- und Teearten sowie durch Kakao

Um die Auswirkungen von weiteren Genussmitteln wie Tee oder Kakao sowie die von verschiedenen Zubereitungsarten von Kaffee auf die *UGT1A*-Expression zu untersuchen, wurden Luciferase-Assays in KYSE70-Zellen durchgeführt. Getestet wurden dabei die Wildtyp-Reportergenkonstrukte von *UGT1A1*, *UGT1A7* und *UGT1A10* sowie ein *UGT1A1*-Konstrukt, das den TATA-Box Polymorphismus A(AT)₆TAA>A(TA)₇TAA (*UGT1A1*28*) enthielt und ein *UGT1A7*-Konstrukt mit dem -57T>G Promotorpolymorphismus (*UGT1A7*12*). Sowohl die *UGT1A7*12*- als auch die *UGT1A1*28*-Variante weisen aufgrund des SNPs eine reduzierte Aktivität auf (52,144). Weiterhin ist die *UGT1A1*28*-Variante für den Phänotyp des M. Gilbert-Meulengracht verantwortlich.

Das *UGT1A1*-1000bp-Wildtyp-Konstrukt zeigte eine signifikante Induktion durch Kaffee (5,4-fach), entkoffeinierten Kaffee (5,4-fach), Instant Kaffee (5,6-fach), French Press Kaffee (4,1-fach) und durch grünen Tee (4,4-fach) (Abb.29). Das *UGT1A1*-Konstrukt, das den TATA-Box-Polymorphismus aufwies, zeigte eine geringfügig schwächere Induzierbarkeit durch die verschiedenen Getränke im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt. Jedoch war diese Reduktion nicht signifikant. Demnach hat der *UGT1A1*-TATA-Box-Polymorphismus keinen signifikanten Einfluss auf die *UGT1A1*-Induzierbarkeit durch Kaffee und Tee.

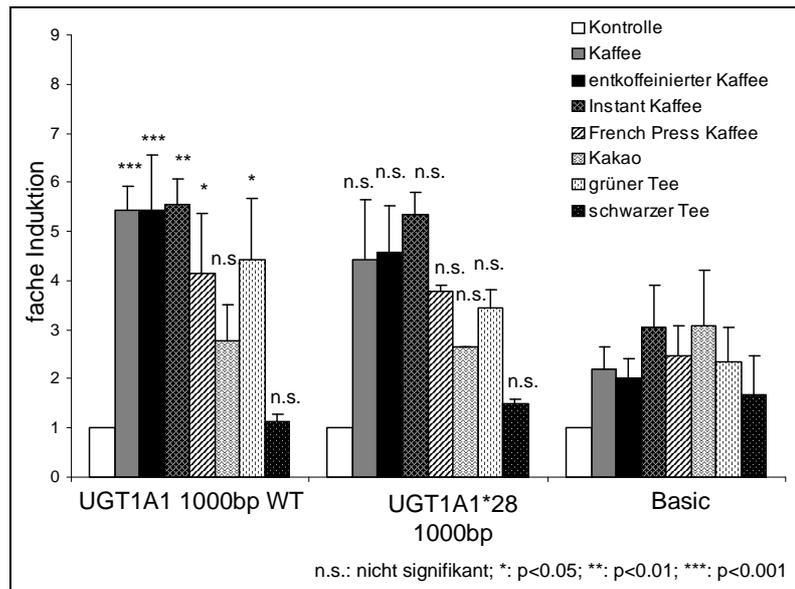


Abb.29: *UGT1A1*-WT- und *UGT1A1**28-Induktion durch verschiedene Kaffeesorten, Kakao und Tee. Signifikanzen wurden für das WT-Konstrukt auf den Basic und für die Variante auf die Werte des WT-Konstruktes bezogen.

Das *UGT1A7*-WT-Konstrukt war im Vergleich zum *UGT1A1*-WT-Konstrukt durch Kaffee (6,2-fach), entkoffeinierten Kaffee (5,8-fach) und Instant Kaffee (6,8-fach) geringfügig höher induzierbar (Abb.30).

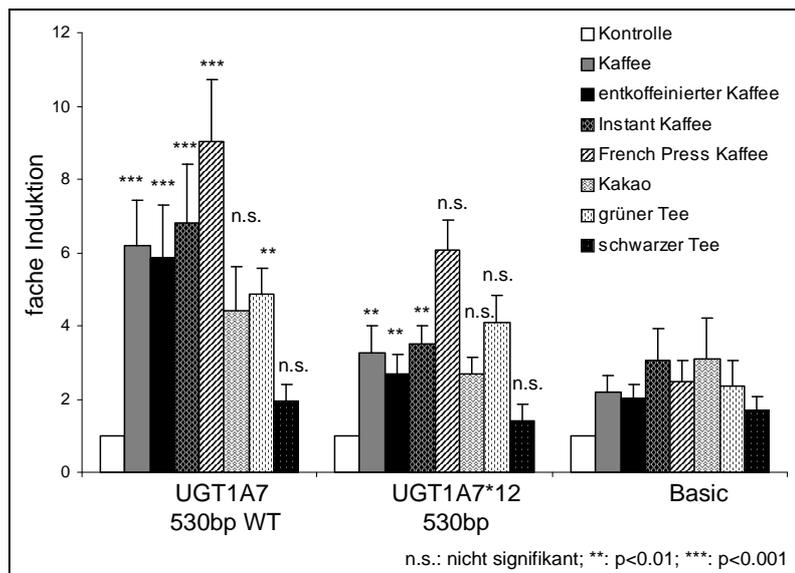


Abb.30: *UGT1A7*-WT- und *UGT1A7**12-Induktion durch verschiedene Kaffeesorten, Kakao und Tee. Signifikanzen wurden für das WT-Konstrukt auf den Basic und für die Variante auf die Werte des WT-Konstruktes bezogen.

Die stärkste Luciferase-Aktivität wurde mit der Behandlung mit French Press Kaffee erzielt (9-fache Induktion). Durch grünen Tee wurde *UGT1A7* lediglich ca. 4,5-fach und durch Kakao sowie schwarzen Tee gar nicht induziert. Die *UGT1A7*12*-Variante wies insgesamt eine geringere Induzierbarkeit durch die verschiedenen Genussmittel auf, wobei diese aber nur für den koffeinhaltigen Kaffee, den entkoffeinierten und den Instant Kaffee signifikant war. Unter Verwendung des koffeinhaltigen Kaffees ergab sich für die *UGT1A7*12*-Variante eine Reduktion der Induzierbarkeit um 47%.

Da in der 5'-upstream Sequenz von *UGT1A10* bis heute keine Polymorphismen identifiziert wurden, wurde nur das *UGT1A10*-WT-Konstrukt verwendet. Es zeigte sich eine 6,1-fache Erhöhung der Luciferase-Aktivität durch Kaffee (Abb.31). Durch entkoffeinierten Kaffee wurde *UGT1A10* ähnlich stark induziert (6-fach). Dahingegen wurde die Transkription des Konstruktes durch Instant Kaffee 9,8-fach, durch French Press Kaffee 9,5-fach und durch Kakao 11,2-fach heraufreguliert. Bei einer Behandlung mit grünem Tee ergab sich eine 5,7-fache und mit schwarzem Tee lediglich eine 3-fache Induktion.

Die Ergebnisse zeigen, dass die *UGT1A*-Induzierbarkeit zwar nicht vom Koffeingehalt, aber von der Art und der Zubereitung des Kaffees abhängt. Weiterhin wird jede *UGT1A*-Isoform in einem spezifischen Ausmaß durch verschiedene Getränke induziert.

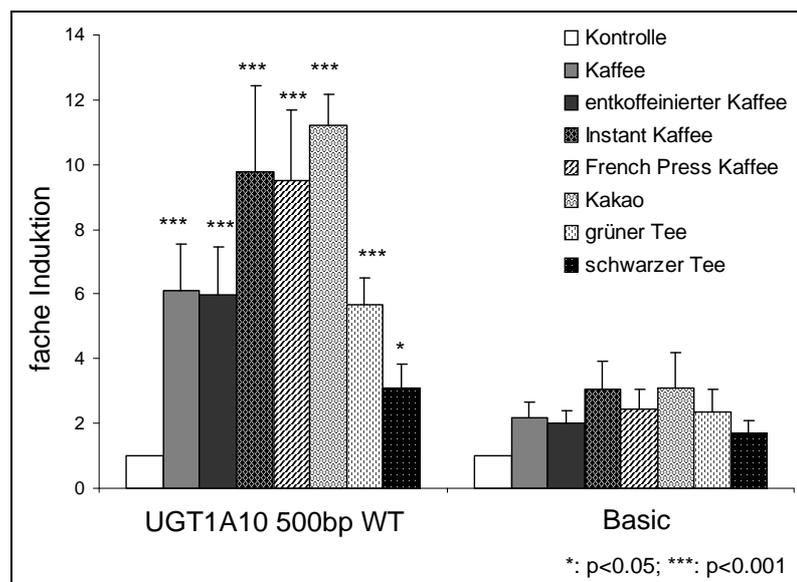


Abb.31: *UGT1A10*-WT-Induktion durch verschiedene Kaffeesorten, Kakao und Tee. Signifikanzen wurden für das WT-Konstrukt auf den Basic und für die Variante auf die Werte des WT-Konstruktes bezogen.

3.3.4 Suche nach den vermittelnden Substanzen der Kaffee-Induktion: Behandlung mit Methylxanthinen und Kaffeelipiden

Um zu untersuchen, ob die Induktion durch Kaffee entweder durch Koffein, einem Koffein-Abbauprodukt oder durch Kaffeelipide vermittelt wird, wurden KYSE70-Zellen im Luciferase-Assay mit Koffein (100 mg/150 ml), Paraxanthin (70 mg/150 ml), Theobromin (9 mg/150 ml), Theophyllin (9 mg/150 ml) oder mit einem Kaffeelipid-Gemisch aus Cafestol (5, 30, 56 μ M) und Kahweol (5, 30, 56 μ M) behandelt. Weder *UGT1A1* noch *UGT1A10* wurde durch Koffein oder durch eines seiner primären Methylxanthinmetabolite in Luciferase-Assays induziert (Abb.32).

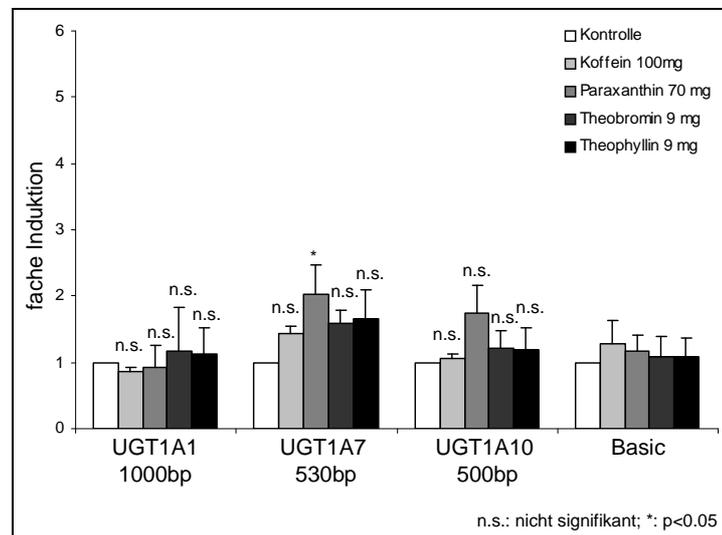


Abb.32: Einfluss der Behandlung mit Methylxanthinen auf die *UGT1A1*-, *UGT1A7*- und *UGT1A10*-regulierte Luciferase-Aktivität. Signifikanzen beziehen sich auf den Basic.

Bei der Verwendung des *UGT1A7*-Reportergenkonstrukts wurde eine signifikante Induktion durch Paraxanthin detektiert, wobei es sich allerdings nur um eine 2-fache Heraufregulierung der Luciferase-Aktivität handelte und nicht an die durch Kaffee (6,2-fach) heranreicht. Durch die Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der Kaffeelipide konnte weder für *UGT1A1* und *UGT1A7* noch für *UGT1A10* eine signifikante Induktion erzielt werden (Abb.33).

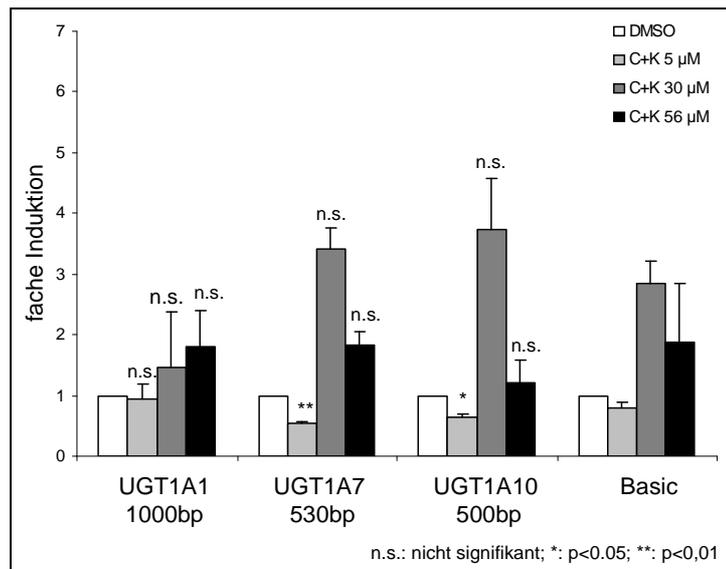


Abb.33: *UGT1A1*-, *UGT1A7*- und *UGT1A10*- Induktion durch verschiedene Konzentrationen von C+K. Signifikanzen beziehen sich auf den Basic-Vektor. C+K= Cafestol+Kahweol.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die durch Kaffee ausgelöste Induktion von *UGT1A1*, *UGT1A7* und *UGT1A10* weder durch Koffein oder seine Abbauprodukte noch durch die Kaffeelipide Cafestol und Kahweol vermittelt werden.

3.3.5 Identifizierung der Kaffeinduktions-vermittelnden Bindungselemente im *UGT1A1*-, *UGT1A7*- und *UGT1A10*-Promotor

In einer Studie von 2008 wurde gezeigt, dass die Kaffeinduktion von NQO1 und GSTA1 in Mäusen abhängig vom Transkriptionsfaktor Nrf2 ist. Weiterhin wurde postuliert, dass die Kaffeinduktion nicht abhängig von AhR ist (128). Da allerdings bei der Röstung der Kaffeebohne Röststoffe entstehen und diese als Xenobiotika potentiell auch AhR aktivieren könnten, sollte in den folgenden Experimenten sowohl eine Beteiligung von Nrf2 als auch eine von AhR an der Kaffeinduktion der *UGT1A*-Gene untersucht werden.

Für die Identifizierung der Bindungselemente, die für die Vermittlung der Kaffeinduktion verantwortlich sind, wurden verschiedene XRE- und ARE-Bindungsstellen in den *UGT1A1*-, *UGT1A7*- und *UGT1A10*-Reportergenkonstrukten mutagenisiert (Abb.34) und im Luciferase-Assay in KYSE70-Zellen auf Induzierbarkeit durch Kaffee und entkoffeinierten Kaffee getestet.

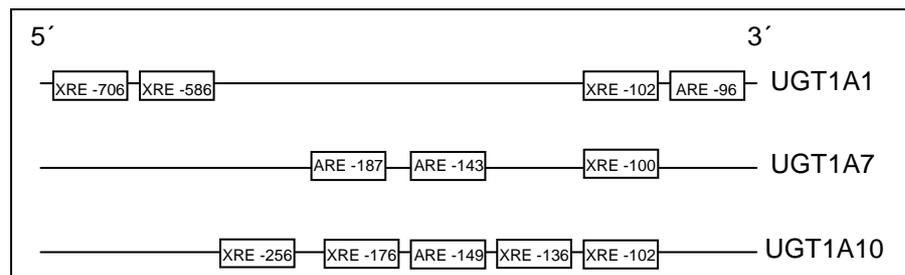


Abb.34: Potentielle XRE- und ARE-Bindungsstellen im *UGT1A1*-, *UGT1A7*- und *UGT1A10*-Promotor.

Da das *UGT1A1*-Konstrukt, das die ersten 1000 bp der *UGT1A1*-5'-upstream Sequenz enthielt, stärker durch Kaffee induzierbar war (5,4-fach) als das Konstrukt mit den ersten 500 bp (4,1-fach), wurde für die Mutagenese der Bindeelemente das 1000 bp-Konstrukt verwendet (Abb.35).

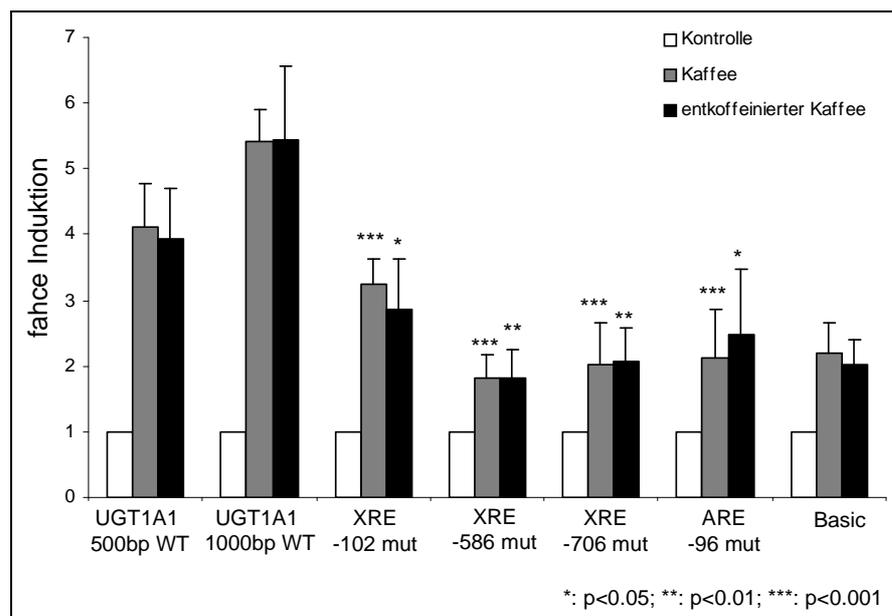


Abb.35: Mutagenese von XRE- und ARE-Bindestellen im *UGT1A1*-Promotor und dessen Einfluss auf die Kaffee-Induktion. Signifikanzen wurden in Bezug auf das *UGT1A1*-1000bp-WT-Konstrukt berechnet.

Es zeigte sich, dass eine Mutation der *UGT1A1*-XRE-586-Bindungsstelle die größte Reduktion der Kaffee-Induzierbarkeit bewirkte. Dennoch resultierte auch eine separate Mutation der XRE-102-, XRE-706- und ARE-96-Bindungsstellen in einer signifikanten Reduktion der Kaffee vermittelten Induktion. Für die Induktion durch entkoffeinierten Kaffee ergaben sich ähnliche Ergebnisse.

Die im *UGT1A7*-Promotor gefundenen potentiellen XRE- und ARE-Bindungs-elemente wurden im *UGT1A7*-530bp-Konstrukt mutagenisiert. Eine Mutation der XRE-100-, ARE-143- oder ARE-187-Bindungsstelle im *UGT1A7*-Konstrukt führte zu einer signifikanten Reduktion der Kaffee vermittelten Induktion (Abb.36).

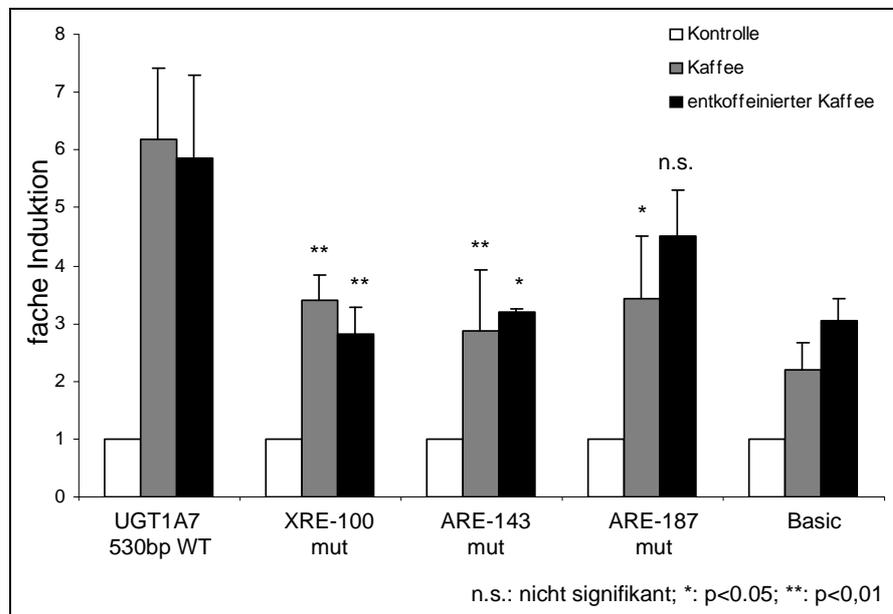


Abb.36: Mutagenese von XRE- und ARE-Bindestellen im *UGT1A7*-Promotor und dessen Einfluss auf die Kaffee-Induktion. Signifikanzen wurden in Bezug auf das *UGT1A7*-WT-Konstrukt berechnet.

Für die Induktion durch entkoffeinierten Kaffee ergaben sich ähnliche Ergebnisse, wobei die Reduktion aufgrund der mutagenisierten ARE-187-Bindungsstelle nicht signifikant war.

Nach Mutagenese der XRE- und ARE-Bindungs-elemente im *UGT1A10*-Promotor ergab sich eine signifikante Reduktion der Kaffee/entkoffeinierten Kaffee vermittelten Induktion bei Mutation der XRE-101-, der XRE-136- und der ARE-149-Bindungsstelle, wobei die Reduktion bei Mutation von XRE-101 am stärksten war (von ca. 6-fach auf 2-fach) (Abb.37). Die Mutation der XRE-176- und XRE-256-Bindungsstellen hatte wie auch bei der vorher beschriebenen TCDD- und *t*BHQ-Induktion keinen Einfluss auf die Kaffeinduktion.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Kaffeinduktion der *UGT1A*-Gene sowohl durch XRE (AhR) als auch durch ARE (Nrf2) vermittelt wird. Dabei hat der Koffeingehalt des Kaffees keinen Einfluss auf diesen regulatorischen Mechanismus.

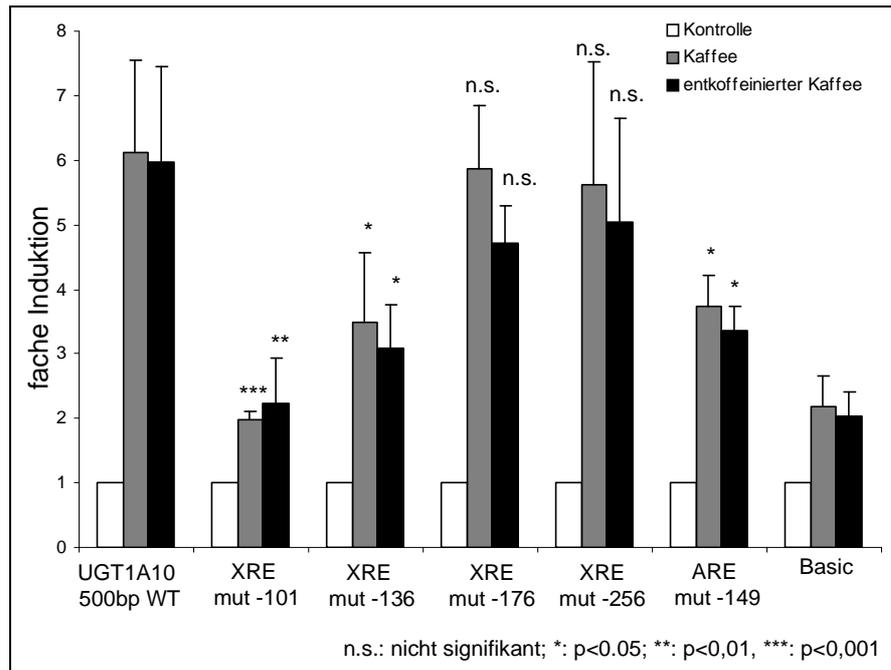


Abb.37: Mutagenese von XRE- und ARE-Bindestellen im *UGT1A10*-Promotor und dessen Einfluss auf die Kaffee-Induktion. Signifikanzen wurden in Bezug auf das *UGT1A10*-WT-Konstrukt ermittelt.

3.3.6 Einfluss eines AhR- und Nrf2-Knockdowns auf die *UGT1A1*-, *UGT1A7*- und *UGT1A10*-Induzierbarkeit durch Kaffee

KYSE70-Zellen wurden mit je 100 nM siRNA (AhR-, Nrf2- oder Kontroll-siRNA) behandelt und die Luciferase-Aktivität der *UGT1A1*-, *UGT1A7*- und *UGT1A10*-Konstrukte nach Kaffee-Behandlung gemessen. Sowohl bei der Verwendung von AhR- als auch bei der von Nrf2-siRNA wurde im Vergleich zur Behandlung mit Kontroll-siRNA eine signifikante Reduktion der *UGT1A1*-Induzierbarkeit durch Kaffee/entkoffeinierten Kaffee detektiert (Abb.38).

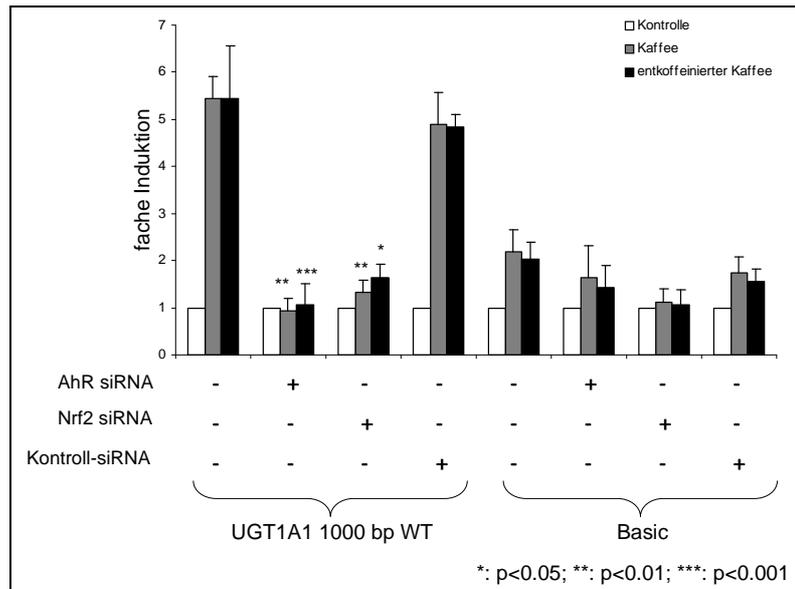


Abb.38: Einfluss eines siRNA vermittelten AhR/Nrf2-Knockdowns auf die Kaffee-Induzierbarkeit von *UGT1A1*. Signifikanzen wurden in Bezug auf die Werte der Kontroll-siRNA berechnet.

Genauso führte die Behandlung mit entweder AhR- oder Nrf2-siRNA zu einer Verminderung der Kaffee/entkoffeinierten Kaffee vermittelten Induktion der *UGT1A7*- und *UGT1A10*-Konstrukte (Abb.39). Demnach ist sowohl der Transkriptionsfaktor AhR als auch Nrf2 essentiell für die Kaffee-Induzierbarkeit von *UGT1A1*, *UGT1A7* und *UGT1A10*.

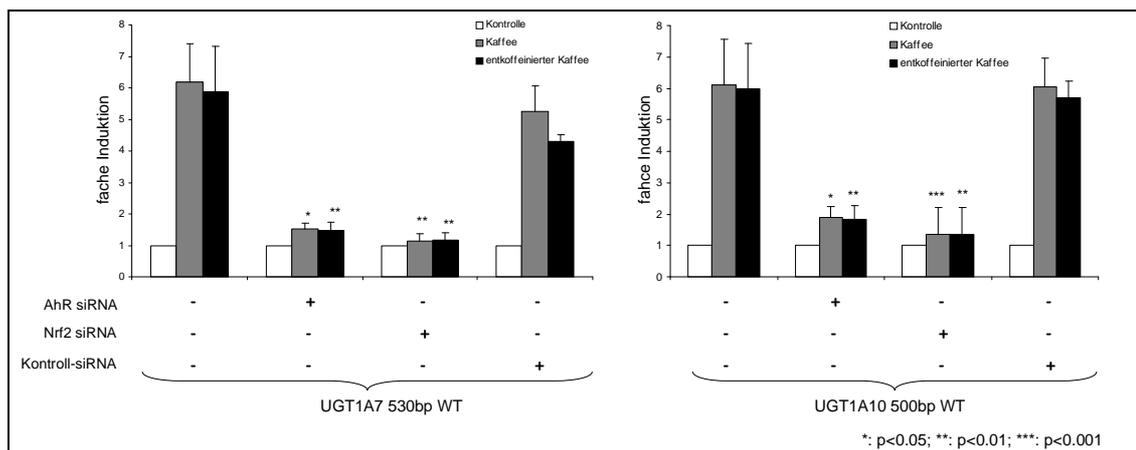


Abb.39: Einfluss eines siRNA vermittelten AhR/Nrf2-Knockdowns auf die Kaffee-Induzierbarkeit von *UGT1A7* und *UGT1A10*. Signifikanzen wurden in Bezug auf die Werte der Kontroll-siRNA berechnet.

3.3.7 UGT1A-mRNA-Induktion in HepG2-, CaCo2- und KYSE70-Zellen

Um zu untersuchen, ob die *UGT1A*-Gene auch auf mRNA-Level und in verschiedenen Zelllinien durch Kaffee induzierbar sind, wurden HepG2-, CaCo2- und KYSE70-Zellen für 24 h mit Kaffee oder entkoffeiniertem Kaffee behandelt, die RNA isoliert und daraus generierte cDNA mit Hilfe der TaqMan PCR UGT1A-spezifisch quantifiziert.

Eine Behandlung der HepG2-Zellen mit Kaffee führte zu einer Induktion der UGT1A1- (17,8-fach), UGT1A3- (11,8-fach), UGT1A4- (5,9-fach), UGT1A6- (5,8-fach), UGT1A7- (1,6-fach), UGT1A9- (2,4-fach) und UGT1A10-mRNA (1,8-fach) (Abb.40). Eine UGT1A8-mRNA konnte in den HepG2-Zellen nicht nachgewiesen werden. Mit Hilfe der „UGT1Aall“-Primer und -Sonden konnten alle UGT1A-mRNAs unabhängig vom Exon 1 detektiert werden. Der relative mRNA-Level ergibt allerdings keine Summe aller Einzellevel, da die Reaktionsbedingungen verschiedener Ansätze aufgrund verschiedener Primer- und Sondereffizienzen nicht miteinander verglichen werden können. Die Behandlung mit entkoffeiniertem Kaffee ergab im Vergleich zu der Behandlung mit koffeinhaltigem Kaffee keine großen Unterschiede in der Induzierbarkeit der UGT1A-mRNA.

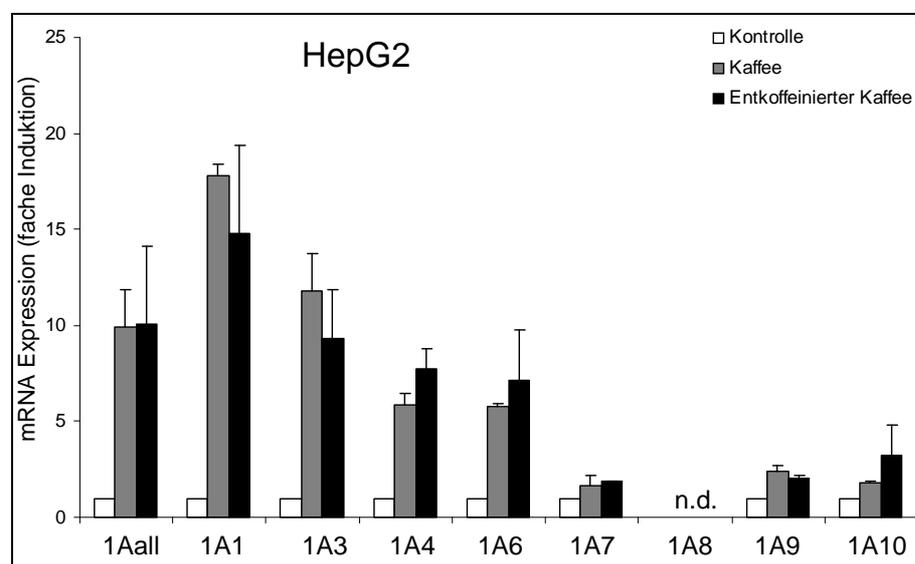


Abb.40: Kaffee vermittelte UGT1A-mRNA-Induktion in HepG2-Zellen.

In den mit Kaffee behandelten CaCo2-Zellen wurden die UGT1A-mRNA-Level auch sehr stark induziert (UGT1A3 7,7-fach, UGT1A4 10-fach, UGT1A6 8,7-fach, UGT1A7 8,8-fach, UGT1A8 8-fach, UGT1A9 3,7-fach, UGT1A10 6-fach), wobei die Kaffee vermittelte Induktion der UGT1A1-mRNA mit einer 29-fachen

Heraufregulierung am stärksten war (Abb.41). Auch hier gab es keine großen Unterschiede zwischen der Induktion mit koffeinhaltigem Kaffee und der mit entkoffeiniertem Kaffee.

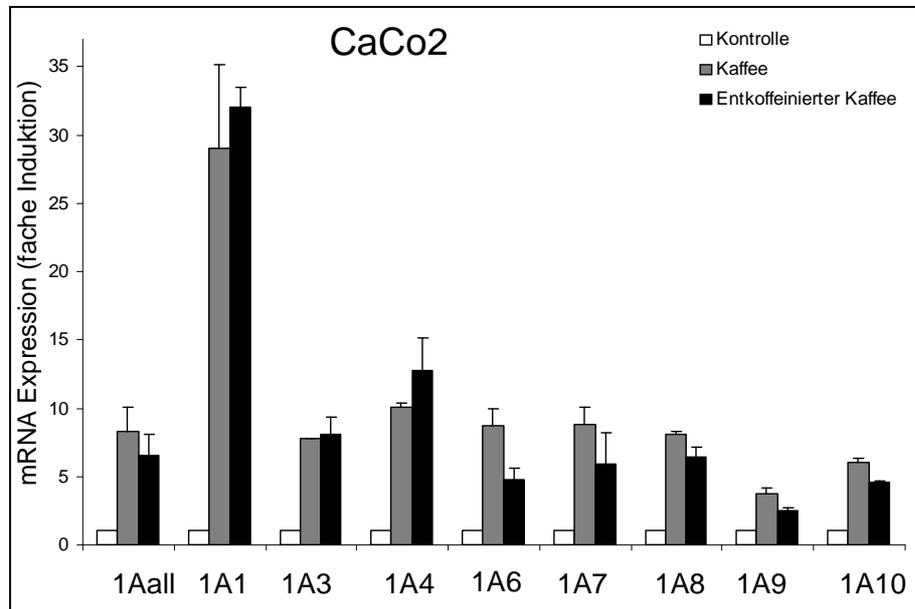


Abb.41: Kaffee vermittelte UGT1A-mRNA-Induktion in CaCo2-Zellen.

Die verwendeten KYSE70-Zellen wurden zusätzlich zum Kaffee auch noch mit AhR-, Nrf2- und Kontroll-siRNA behandelt, um zu untersuchen, ob die vom Kaffee vermittelte UGT1A-mRNA-Induktion von den Transkriptionsfaktoren AhR und Nrf2 abhängig ist. Eine separate Behandlung der KYSE70-Zellen mit koffeinhaltigem Kaffee resultierte in einer sehr starken Induktion der UGT1A1-mRNA (20-fach) (Abb.42). Auch die mRNA-Level von UGT1A3 (6,9-fach), UGT1A4 (7,2-fach), UGT1A6 (5,8-fach), UGT1A7 (4-fach), UGT1A8 (4,1-fach), UGT1A9 (2,6-fach) und UGT1A10 (6,6-fach) wurden moderat gesteigert. Gravierende Unterschiede zwischen der Kaffee und der entkoffeinierten Kaffee vermittelten Induktion bestanden nicht. Der Gebrauch von entweder AhR-siRNA oder Nrf2-siRNA führte zu einer fehlenden Kaffee-Induzierbarkeit aller getesteten UGT1A-mRNAs im Vergleich zur verwendeten Kontroll-siRNA. Die Ergebnisse zeigen, dass die Kaffee vermittelte Induktion der UGT1A-mRNA sowohl von AhR als auch von Nrf2 abhängig ist.

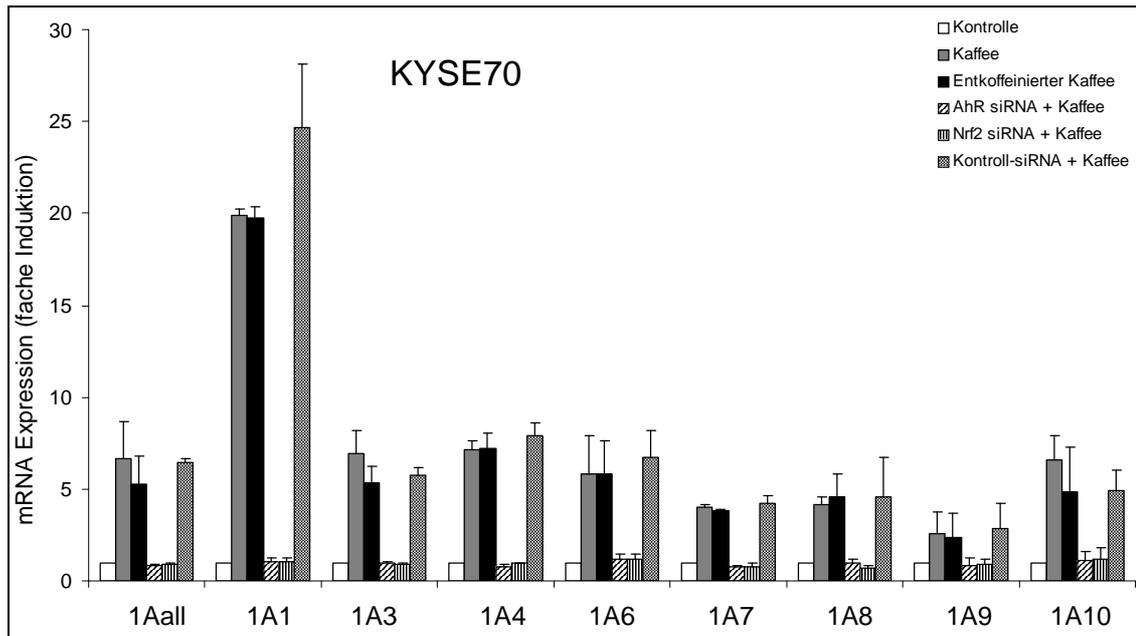


Abb.42: Kaffee vermittelte UGT1A-mRNA-Induktion in KYSE70-Zellen und Einfluss eines siRNA vermittelten AhR/Nrf2-Knockdowns auf die Kaffeinduktion der UGT1A-mRNA.

3.3.8 Kaffee vermittelte Aktivierung von AhR und Nrf2

Die bisherigen Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung der Transkriptionsfaktoren AhR und Nrf2 an der durch Kaffee vermittelten Induktion der verschiedenen UGTs hin. Daher sollte mittels Western Blot untersucht werden, ob die beiden Transkriptionsfaktoren durch Kaffee aktiviert werden. HepG2-, CaCo2- und KYSE70-Zellen wurden für 48 h mit Kaffee inkubiert und 20 µg der gewonnenen Zelllysate in den Western Blot eingesetzt. Wie in Abb.43 A zu sehen ist, wurde AhR auf Proteinebene durch die Behandlung mit Kaffee im Vergleich zur Kontrolle in allen getesteten Zelllinien aktiviert.

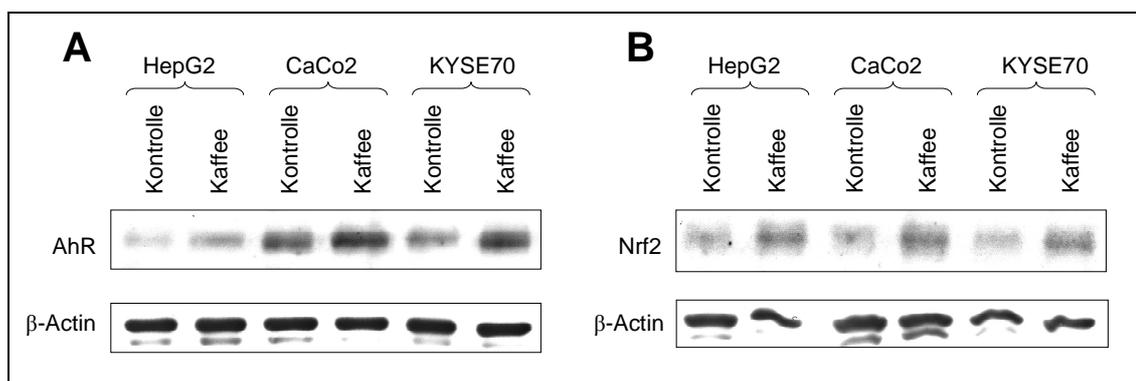


Abb.43: AhR/Nrf2-Aktivierung durch Kaffee in HepG2-, CaCo2- und KYSE70-Zellen.

Analog dazu wurde auch Nrf2 durch eine Kaffee-Behandlung in allen Zelllinien aktiviert (Abb.43 B). Aus den Western Blot Ergebnissen kann man schließen, dass AhR und Nrf2 durch Kaffee aktiviert werden und höchstwahrscheinlich direkt an der durch Kaffee vermittelten *UGT1A*-Regulation beteiligt sind.

3.3.9 Kaffee vermittelte *UGT1A*-Regulation im humanisierten *tgUGT1A-WT*-Mausmodell

Sechs männlichen und sechs weiblichen transgenen *UGT1A*-Mäusen sowie vier weiblichen und vier männlichen C57BL/6J-Mäusen (Null-Kontrolle) wurde für drei Tage Kaffee-Stammlösung (siehe 2.2.21) zu trinken gegeben. Nach Ablauf der Zeit wurden die Mäuse getötet, die Organe entnommen und RNA isoliert. Die daraus generierte cDNA wurde in eine *UGT1A*-spezifische TaqMan PCR eingesetzt. Als Kontrolle dienten unbehandelte transgene *UGT1A-WT*-Mäuse (3 Pools a 4 männliche und 4 weibliche Mäuse). Die C57BL/6J-Mäuse zeigten kein Signal in der TaqMan PCR, da sie kein humanes *UGT1A*-Transgen enthielten (Daten nicht gezeigt). Abb.44 zeigt einige Beispiele der Kaffee vermittelten Induktion von verschiedenen *UGT1A*-Isoformen in der *tgUGT1A-WT*-Maus. Vergleicht man die mRNA-Level der Kontrollgruppe mit denen der Kaffee-behandelten Mäuse, erkennt man deutlich eine Induktion der *UGT1A1*-Expression in der Leber (Abb. 44 A). Wenn man Mittelwerte aus den Kontroll-Pools bildet, ergibt sich eine 6,4-fache *UGT1A1*-mRNA-Induktion durch Kaffee in männlichen und eine 10-fache Induktion in weiblichen Tieren. Im Jejunum wird dahingegen nur die *UGT1A3*-Expression in männlichen Tieren durch Kaffee erhöht (7,7-fach) (Abb.44 B).

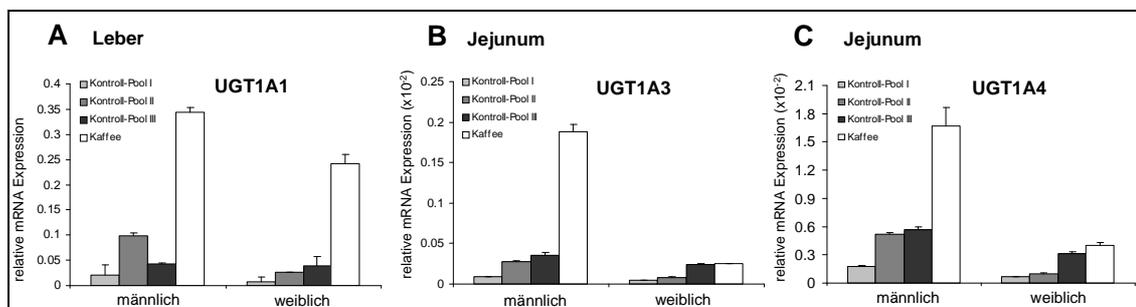


Abb.44: Kaffee vermittelte *UGT1A*-mRNA-Induktion in der Leber und im Jejunum von humanisierten transgenen *UGT1A-WT*-Mäusen.

Analog dazu wird auch *UGT1A4* im Jejunum durch Kaffee ausschließlich in männlichen *tgUGT1A*-Mäusen heraufreguliert (4-fach) (Abb.44 C).

Im Kolon wurde genau wie im Jejunum ausschließlich eine *UGT1A*-Induktion durch Kaffee in männlichen Mäusen beobachtet. Dabei wurde die Expression von *UGT1A3* 3-fach und die von *UGT1A4* 2,9-fach durch Kaffee heraufreguliert (Abb.45).

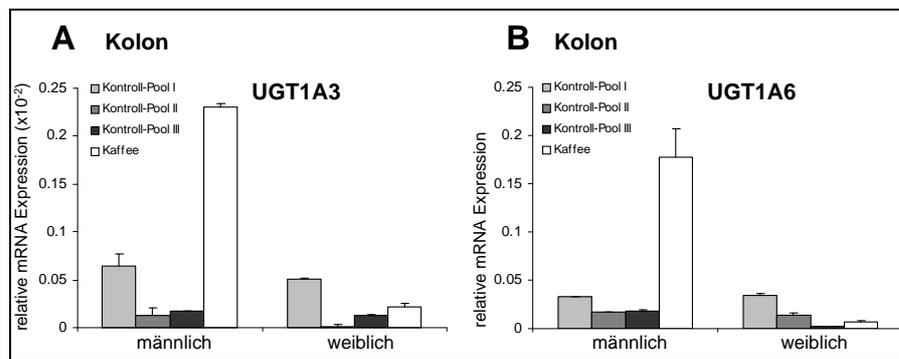


Abb.45: Kaffee vermittelte *UGT1A*-mRNA-Induktion im Kolon von humanisierten transgenen *UGT1A-WT*-Mäusen.

Die stärkste Kaffee vermittelte *UGT1A*-Induktion zeigte sich im Magen von weiblichen und männlichen *tgUGT1A*-Mäusen. Dabei wurde *UGT1A1* in Männchen 11-fach und in Weibchen 9,2-fach durch Kaffee induziert (Abb.46 A). In den transgenen *UGT1A-WT*-Kontrollmäusen wurde *UGT1A4* nur sehr geringfügig oder gar nicht exprimiert. Durch die Kaffeebehandlung konnte die *UGT1A4*-Expression jedoch sehr stark heraufreguliert werden (Abb.46 B). Weiterhin wurde die *UGT1A6*-Transkription im Magen durch die Behandlung mit Kaffee in Männchen 13,4-fach und in Weibchen 14-fach gesteigert (Abb.46 C).

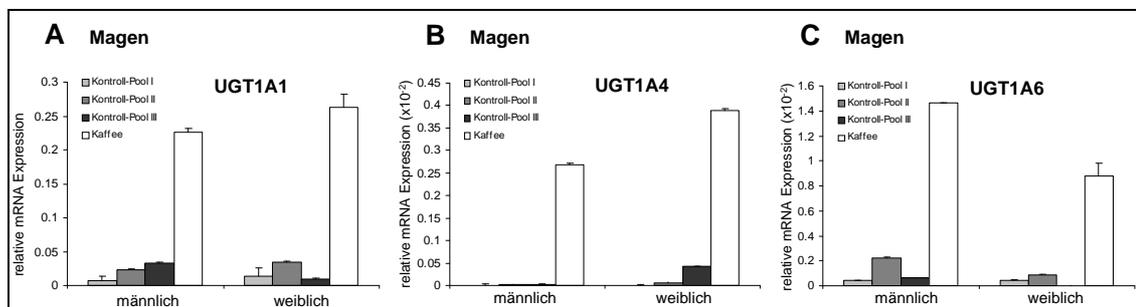


Abb.46: Kaffee vermittelte *UGT1A*-mRNA-Induktion im Magen von humanisierten transgenen *UGT1A-WT*-Mäusen.

Mit Hilfe der humanisierten transgenen *UGT1A-WT*-Maus ließ sich zeigen, dass die humane *UGT1A*-Induktion durch Kaffee auch *in vivo* stattfindet. Dabei wurde festgestellt, dass es geschlechtsspezifische Unterschiede in der Induktion von verschiedenen *UGT1A*-Isoformen gab. Im Magen wurde sowohl in Männchen als auch in Weibchen die stärkste Heraufregulierung der *UGT1A*-mRNA durch Kaffee beobachtet.

3.4 Charakterisierung der verschiedenen *UGT1A*-Transkriptvarianten (v1/v2/v3) im humanisierten *tgUGT1A*-Mausmodell und der Einfluss von SNPs auf die Expression der Varianten

Für die Charakterisierung der durch das alternative Splicing generierten *UGT1A*-Transkriptvarianten v1, v2 und v3 wurde aus der RNA drei verschiedener Pools (jeder Pool bestehend aus 4 weiblichen *tgUGT1A-WT*- bzw. 4 weiblichen *tgUGT1A-SNP*-Mäusen) cDNA hergestellt und je eine PCR spezifisch für die Transkriptvariante v1 und eine für die Varianten v2/3 durchgeführt. Da die Translation der Varianten v2 und v3 zur Herstellung des identischen Proteins führen, wurden beide Varianten in einer einzigen PCR erfasst. Um den Einfluss von SNPs auf die Expression der verschiedenen Transkriptvarianten zu untersuchen, wurden alle PCR's sowohl mit der cDNA der *tgUGT1A-WT*-Mauslinie als auch mit der der *tgUGT1A-SNP*-Mauslinie durchgeführt. Dabei wurden die Transkriptvarianten in Leber, Magen, Jejunum, Kolon und Niere analysiert. Abb.47 zeigt beispielhaft eine Varianten-spezifische PCR eines einzelnen Pools (bestehend aus je 4 weiblichen *tgUGT1A-WT*- oder *tgUGT1A-SNP*-Mäusen). Die Intensität der Banden der insgesamt drei durchgeführten PCR's pro Mauslinie wurde mit Hilfe der Software PCBAS 2.0 gemessen und jeweils durch den Wert der zugehörigen Actin-Bande geteilt. Es wurden ein Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und die Ergebnisse in Abb.48 dargestellt.

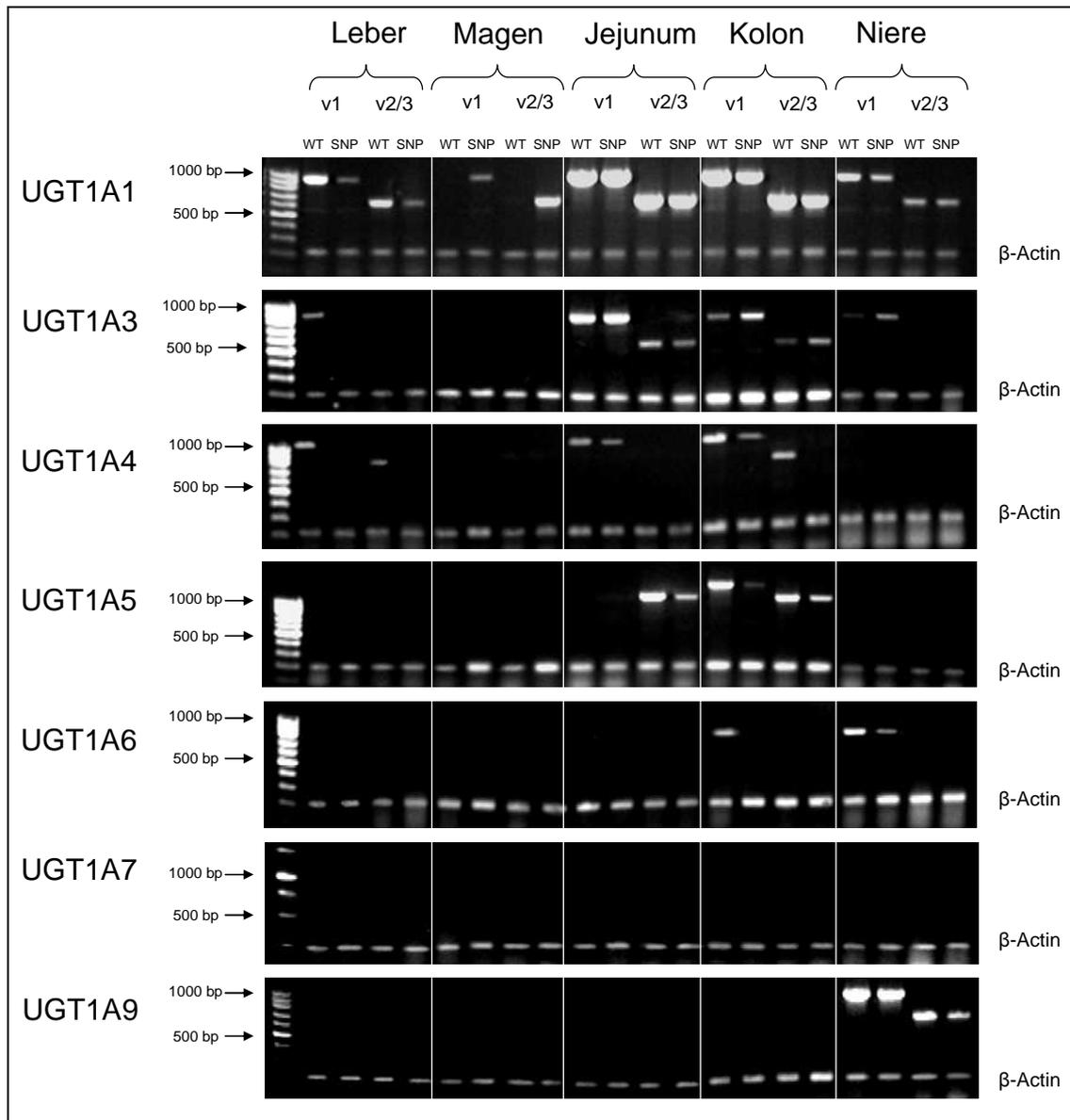


Abb.47: Beispielhafte UGT1A-Transkriptvarianten-spezifische PCR von je einem RNA-Pool weiblicher *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäuse in Leber, Magen, Jejunum, Kolon und Niere. Als interne cDNA-Mengen-Kontrolle wurde nach 10 Zyklen Actin-Primer zugegeben. PCR-Produkt-Längen: 1A1_v1= 886 bp; 1A1_v2/3= 619 bp; 1A3_v1= 873 bp; 1A3_v2/3= 606 bp; 1A4_v1= 1039 bp; 1A4_v2/3= 772 bp; 1A5_v1= 1329 bp; 1A5_v2/3= 1062 bp; 1A6_v1= 882 bp; 1A6_v2/3= 615 bp; 1A7_v1= 1305 bp; 1A7_v2/3= 1038 bp; 1A9_v1= 961 bp; 1A9_v2/3= 694 bp; Actin: 200 bp. Vergleiche mit der UGT1A-Transkriptvarianten-Verteilung in verschiedenen humanen Organen (Abb.3).

UGT1A1_v1 wurde in Leber, Jejunum, Kolon und Niere von *tgUGT1A-WT*-Mäusen detektiert. In *tgUGT1A-SNP*-Mäusen wurde UGT1A_v1 in denselben Organen detektiert, wurde aber im Vergleich zur *tgUGT1A-WT*-Maus in Leber, Kolon und Niere signifikant schwächer exprimiert. UGT1A1_v2/3 wurde in beiden Mauslinien in Leber, Jejunum, Kolon und Niere nachgewiesen, wobei die Expression in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen in der Leber und im Kolon im Vergleich zur *tgUGT1A-WT*-Maus signifikant

reduziert war. Interessanterweise konnten die Transkriptvarianten UGT1A1_v1 und v2/3 im Magen ausschließlich in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen detektiert werden.

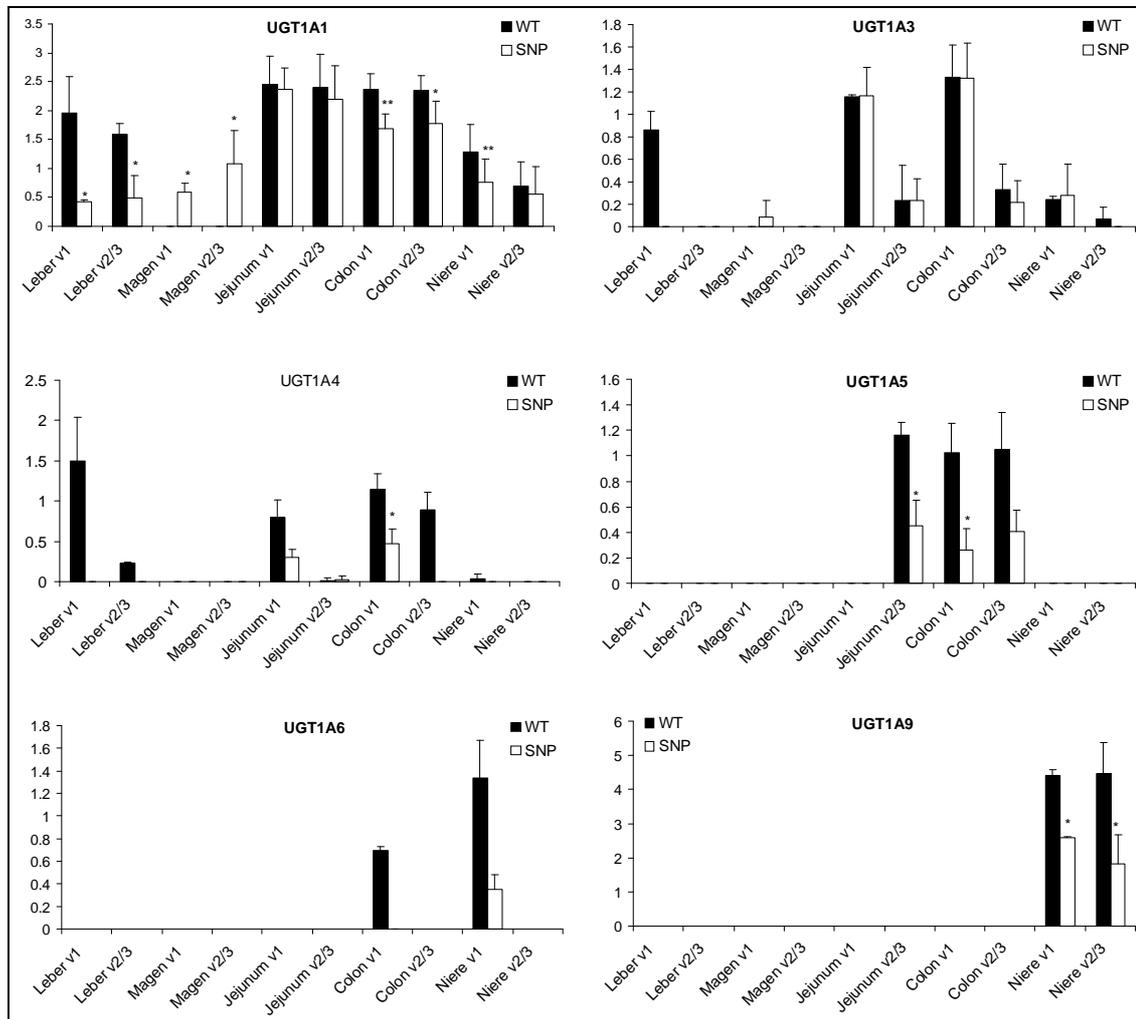


Abb.48: Expression der verschiedenen UGT1A-Transkriptvarianten in Leber, Magen, Jejunum, Kolon und Niere von *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen. Die Säulen entsprechen den errechneten Mittelwerten aus der Bandenintensität von drei PCR's, die unter Verwendung der RNA von je drei verschiedenen RNA-Pools einer Mauslinie durchgeführt wurden. Zusätzlich wurde der Intensitätswert einer Bande durch den Wert der zugehörigen Actin-Bande geteilt, um die Werte zu normalisieren. Signifikanzen wurden für die Expression verschiedener Varianten in der *tgUGT1A-SNP*-Maus im Vergleich zur Expression in der *tgUGT1A-WT*- Maus berechnet.

UGT1A3_v1 wurde in der Leber ausschließlich in *tgUGT1A-WT*-Mäusen und im Jejunum, Kolon und Niere in beiden Mauslinien in vergleichbaren Mengen nachgewiesen. Dahingegen wurde UGT1A3_v2/3 in Jejunum, Kolon und Niere in beiden Mauslinien in einem geringeren Maß gebildet. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien bestanden allerdings nicht. Im Magen konnte UGT1A3_v1 wiederum nur in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen detektiert werden. Die

Expression der Transkriptvariante UGT1A4_v1 konnte in der Leber ausschließlich in *tgUGT1A-WT*-Mäusen und im Jejunum und Kolon in beiden Mauslinien nachgewiesen werden, wobei die *tgUGT1A-SNP*-Maus UGT1A4_v1 in Jejunum und Kolon in einem geringeren Maß exprimierte. Eine sehr geringe Expression von UGT1A4_v1 konnte auch in der Niere von *tgUGT1A-WT*-Mäusen beobachtet werden. Die Variante UGT1A4_v2/3 war ausschließlich in der Leber von *tgUGT1A-WT*-Mäusen zu finden, wobei die Expression sehr viel schwächer als die von UGT1A4_v1 war. Weiterhin wurde UGT1A4_v2/3 sehr schwach in Jejunum in beiden Mauslinien exprimiert, während v2/3 im Kolon nur in *tgUGT1A-WT*-Mäusen detektiert wurde. Die Transkriptvariante UGT1A5_v1 wurde exklusiv im Kolon gebildet, wobei die Expression in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen signifikant niedriger war im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen. Dahingegen wurde UGT1A5_v2/3 in Jejunum und Kolon nachgewiesen. Die Transkriptmenge war im Vergleich zu den *tgUGT1A-WT*-Mäusen in den *tgUGT1A-SNP*-Mäusen stark reduziert, der Unterschied war allerdings nur im Jejunum signifikant. Die Expression von UGT1A6_v1 wurde im Kolon ausschließlich in *tgUGT1A-WT*-Mäusen und in der Niere in beiden Mauslinien detektiert. Obwohl die Menge an UGT1A6_v1 in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen sehr viel geringer war, war der Unterschied nicht signifikant. Die Transkriptvariante UGT1A6_v2/3 sowie die Varianten UGT1A7_v1 und UGT1A7_v2/3 konnten in keinem untersuchten Organ nachgewiesen werden. Dahingegen wurden UGT1A9_v1 und v2/3 ausschließlich in der Niere exprimiert, wobei diese in *tgUGT1A-SNP*-Mäusen im Vergleich zu *tgUGT1A-WT*-Mäusen signifikant reduziert war.

Um zu zeigen, dass die verwendeten Primer spezifisch für humane UGT1A-Transkripte sind und nicht gleichzeitig an *Ugt1A*-Transkripte der Maus-*Ugt*'s binden, wurde mit der cDNA, die aus der RNA von vier weiblichen nicht-transgenen C57BL/6J-Mäusen generiert wurde, die gleiche Varianten-spezifische PCR durchgeführt (Abb.49). Da dabei jedoch keine einzige UGT1A-Transkriptvariante detektiert werden konnte, kann man davon ausgehen, dass die Primer spezifisch an die humanen UGT1A-Transkripte binden. In der Studie von *Girard et al.* (24) wurde aus verschiedenen humanen Geweben RNA isoliert und die verschiedenen Transkript-Varianten wurden bestimmt (Abb.3). Vergleicht man die Ergebnisse von *Girard et al.* mit denen dieser Arbeit kann man einige Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede in der Transkript-Verteilung feststellen. In dieser Arbeit wurde anstelle des Ösophagus der Magen verwendet, weil es nicht möglich war, aus dem kleinen Ösophagus der Maus RNA zu isolieren.

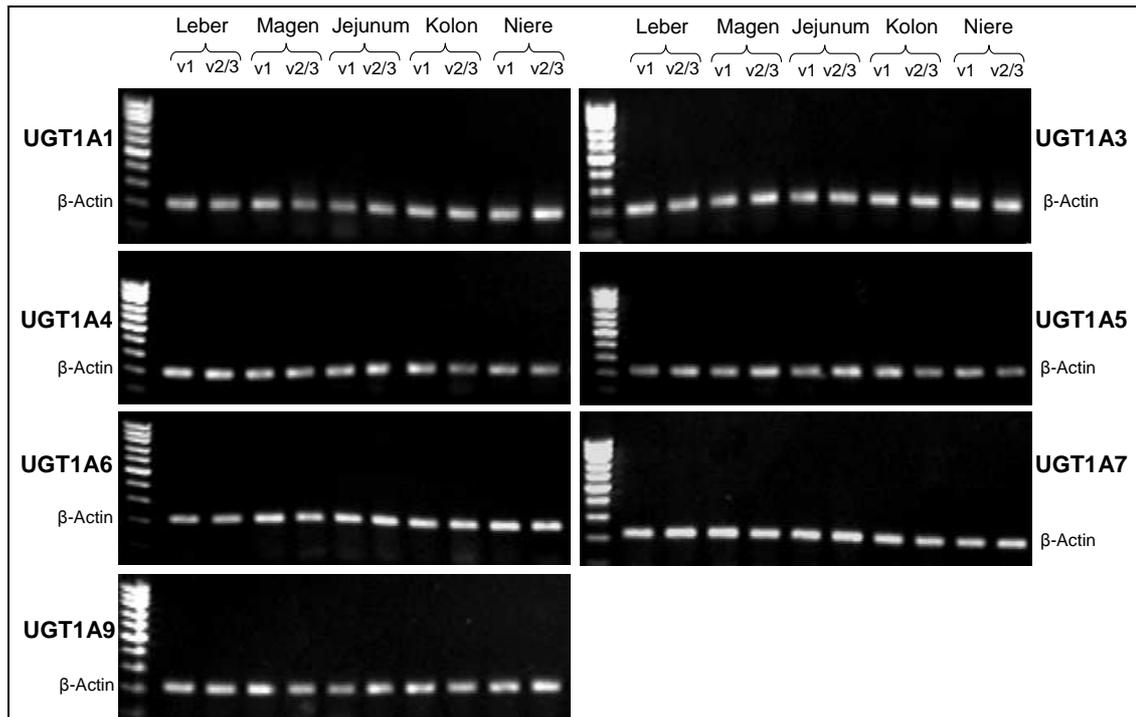


Abb.49: Negativ-Kontrolle: UGT1A-Transkriptvarianten-spezifische PCR von einem RNA-Pool weiblicher nicht-transgener C57BL/6J-Mäuse in Leber, Magen, Jejunum, Kolon und Niere. Als interne cDNA-Mengen-Kontrolle wurde nach 10 Zyklen Actin-Primer zugegeben.

In der Leber der *tgUGT1A-WT*-Maus werden die Varianten UGT1A1_v1 und UGT1A1_v2 zum Beispiel genau wie bei *Girard et al.* etwa gleich stark exprimiert. Gemeinsamkeiten weisen auch die Ergebnisse für die UGT1A4-Transkriptvarianten in Leber und Kolon auf. Dennoch gibt es auch viele Unterschiede: *UGT1A6* und *UGT1A9* werden in der *tgUGT1A-WT*-Maus im Gegensatz zum humanen Gewebe nicht in der Leber exprimiert. Auch *UGT1A7*, das im Menschen im Ösophagus und Magen exprimiert wird, konnte nicht im Magen der *tgUGT1A-WT*-Maus nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass zwischen dem Mensch und der humanisierten *tgUGT1A-WT*-Maus in Bezug auf die UGT1A_v1/v2/v3-Transkriptverteilung neben einigen Gemeinsamkeiten viele Unterschiede bestehen. Weiterhin konnte mit den Ergebnissen dieser Arbeit weiterführend gezeigt werden, dass Polymorphismen einen entscheidenden Einfluss auf die Expression der verschiedenen Transkriptvarianten haben. Zum Teil werden Transkriptvarianten in der *tgUGT1A-SNP*-Maus höher, zum großen Teil aber niedriger im Vergleich zur *tgUGT1A-WT*-Maus exprimiert.

4. Diskussion

4.1 Hohe Konservierung der *UGT1A10*-Promotorsequenz

Da der Mensch täglich potentiell toxische oder karzinogene Substanzen aus seiner Umwelt, z.B. über die Nahrung, aufnimmt, ist es von hoher Bedeutung, einen Mechanismus für die Detoxifizierung dieser Substanzen aktivieren zu können. Dabei spielen UGTs eine wichtige Rolle, indem sie oxidierte und potentiell karzinogene Verbindungen mit Glukuronsäure konjugieren und damit ihre Ausscheidung über Galle oder Urin ermöglichen. Die Glukuronidierung von verschiedenen Substraten durch UGTs weist allerdings eine hohe Variabilität zwischen verschiedenen Individuen auf, da die UGT-Aktivität von der Präsenz von Polymorphismen und von verschiedenen aktivierenden und inhibierenden endo- und xenobiotischen Substanzen abhängt (19,145). In der Vergangenheit wurden bereits *UGT1A*-Polymorphismen beschrieben, die z.B. mit HCC oder einer erhöhten Pharmakotoxizität assoziiert sind (48,65). Interessanterweise wurden allein in den Promotoren der *UGT1A8*- und *UGT1A10*-Gene noch keine Polymorphismen entdeckt. Auch keine der 76 in dieser Arbeit getesteten Personen wies einen Polymorphismus innerhalb der ersten 1000 bp der *UGT1A10*-Promotorsequenz auf (siehe 3.1). Daher kann man davon ausgehen, dass die Promotorsequenz von *UGT1A10* sehr konserviert ist. Ein auftretender Polymorphismus hätte eventuell einen Nachteil für den Organismus gebracht und hat sich daher in der Evolution nicht durchgesetzt.

4.2 Bedeutung der *UGT1A8*- und *UGT1A10*-Gene als indirekte Antioxidantien: Koordinierte Regulation durch den ROS-aktivierten Transkriptionsfaktor Nrf2 und den Xenobiotika-aktivierten Transkriptionsfaktor AhR

UGT1A10 kommt eine wichtige Aufgabe in der gastrointestinalen Barriere zu, denn das Enzym glukuronidiert eine Reihe von Medikamenten (84-88), aber auch karzinogene Substanzen wie BaP, das als Vorläufer von ROS bekannt ist (14,50,146). Die Auswirkung von ROS-induziertem oxidativen Stresses hängt von dem Ausmaß, der Dauer und dem Vermögen der Zelle, die physiologische Balance wiederherzustellen, ab. Starker oxidativer Stress trägt zu altersbedingten Krankheiten wie kardiovaskulären

Krankheiten, chronischen Entzündungen, neurodegenerativen Erkrankungen und Krebs bei (5,147-149). Die Induktion von Abwehrgenen der Phase II (wie z.B. UGTs) ist für die Wiederherstellung der zellulären Redox-Homöostase essentiell, um oxidative Schäden zu vermeiden oder zu reduzieren (150,151). Die meisten dieser antioxidativen oder detoxifizierenden Gene werden durch eine ARE-Bindestelle im Promotor reguliert. Dabei ist Nrf2 der zentrale Transkriptionsfaktor, der sowohl die konstitutive als auch die induzierbare ARE vermittelte Genexpression reguliert (151). Nrf2-Knockout-Mäuse, die einen Defekt in der Aktivierung dieses protektiven genetischen Programms aufweisen, zeigen eine vermehrte Empfänglichkeit gegenüber oxidativen Schäden (152,153). Aktuelle Studien haben eine Verbindung zwischen dem Nrf2- und AhR-Pathway gezeigt. Allerdings fehlt bis heute eine genaue Charakterisierung dieses Crosstalks. Die Ergebnisse dieser Arbeit identifizieren und charakterisieren die Interaktion von Nrf2 und AhR in der Regulation von *UGT1A10* und *UGT1A8* im Vergleich zu dem nicht Nrf2-regulierten *UGT1A9*-Gen. Als indirekte Antioxidantien spielen *UGT1A10* und *UGT1A8* eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Redox-Balance im Gastrointestinaltrakt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Glukuronidierung nicht nur durch ihre xenobiotischen Substrate, sondern auch durch oxidativen Stress reguliert wird.

UGT1A10 konnte sowohl durch AhR als auch durch Nrf2 induziert werden. Erstaunlich war dabei jedoch, dass eine separate Eliminierung der XRE-101-, XRE-136- oder ARE-149-Bindungsstelle zu einem gleichzeitigen Verlust der TCDD- und *t*BHQ-Induzierbarkeit führte (siehe 3.2.2). Zwar wurde eine Abhängigkeit der TCDD-Induktion von einem intakten ARE schon für *UGT1A6* gezeigt (105), jedoch war die Reduktion der Nrf2 vermittelten Induktion durch die XRE-Mutagenese völlig neu und eröffnet neue Einblicke in den Crosstalk der AhR- und Nrf2-Pathways.

Das Expressionsmuster von *UGT1A8* ist dem von *UGT1A10* sehr ähnlich (66). Außerdem weist der *UGT1A8*-Promotor im Vergleich zum *UGT1A10*-Promotor eine Sequenzhomologie von 89,6% auf. Weiterhin sind die XRE-101- und ARE-149-Bindestellen in beiden Promotoren identisch. Daher war zu erwarten, dass auch der *UGT1A8*-Promotor in einem ähnlichen Ausmaß durch TCDD und *t*BHQ induziert wurde. Auch die Mutagenese der XRE-101- und ARE-149-Bindungsstellen im *UGT1A8*-Promotor resultierte in einem gleichzeitigen Verlust der TCDD- und *t*BHQ-Induzierbarkeit (siehe 3.2.3).

Im Gegensatz dazu stimmen die ersten 500 bp der *UGT1A9*-Promotorsequenz nur zu 82,6% mit denen von *UGT1A10* überein und die ARE-143-Bindungsstelle unterscheidet sich von der *UGT1A10*-ARE-149-Sequenz in einem einzigen Basenpaar (Abb.12). *UGT1A9* wird als einziges Gen des *UGT1A7-10*-Clusters in der Leber exprimiert. Es unterscheidet sich von *UGT1A8* und *UGT1A10* durch das Fehlen einer signifikanten *t*BHQ-Induzierbarkeit (Abb.11), obwohl es in seinem Promotor eine ARE-Bindungsstelle gibt, die der ARE-Konsensus-Sequenz sehr ähnlich ist. Wenn die ARE-143-Sequenz von *UGT1A9* so mutagenisiert wurde, dass sie der ARE-149-Sequenz von *UGT1A10* entsprach (Ausstausch eines einzelnen Basenpaares: von „T“ zu „G“ an Position -137, siehe Abb.12), ergab sich für *UGT1A9* eine neu entstandene *t*BHQ-Induzierbarkeit (siehe 3.2.6). Dahingegen führte eine Mutagenese der *UGT1A10*-ARE-Sequenz entsprechend der ARE-Sequenz von *UGT1A9* zu einem Verlust der Nrf2 vermittelten Induktion (siehe 3.2.5). Gleichzeitig wurde jedoch auch die TCDD-Induzierbarkeit stark reduziert. Diese Promotoranalysen weisen darauf hin, dass dieser Basenpaarunterschied für das Vorhandensein einer *t*BHQ vermittelten Induktion verantwortlich ist und dass die TCDD-Induzierbarkeit direkt abhängig von einer intakten ARE-Bindungsstelle zu sein scheint. Die differentielle Regulation von *UGT1A10* und *UGT1A9* trägt auch zur Aufklärung der gewebespezifischen Expressionsmuster trotz einer hohen Sequenzhomologie bei.

Die siRNA-Experimente zeigen, dass die Präsenz von AhR essentiell für die Nrf2 vermittelte Induktion von *UGT1A10* und *UGT1A8* ist, sowie eine TCDD-Induktion das Vorhandensein von Nrf2 erfordert (Abb.19). Wird die Expression von nur einem Transkriptionsfaktor herunterreguliert, geht sowohl die TCDD- als auch die *t*BHQ vermittelte Induktion verloren. Dahingegen wurde die TCDD-Induzierbarkeit von *UGT1A9* nicht durch den Knockdown von Nrf2 beeinflusst (Abb.20). Auch die TCDD-Induzierbarkeit des *UGT1A9*-Konstruktes mit der ARE-Sequenz, die entsprechend der *UGT1A10*-ARE-Sequenz mutiert war, zeigte keine Abhängigkeit von der Präsenz von Nrf2, auch wenn seine *t*BHQ-Induzierbarkeit sehr wohl vom Vorhandensein von AhR abhing (Abb.20).

In der Studie von *Miao et al.* (107) wird postuliert, dass die *Nrf2*-Transkription durch TCDD induziert wird. Um auszuschließen, dass entweder die Transkriptionsfaktoren gegenseitig ihre Expression heraufregulieren oder die siRNA unspezifisch ist, wurden die Proteinlevel von AhR und Nrf2 in Antwort auf TCDD-, *t*BHQ- und siRNA-Behandlung untersucht. Dabei zeigte sich, dass TCDD ausschließlich AhR und *t*BHQ

ausschließlich Nrf2 aktiviert und die siRNA nur spezifisch für ihr jeweiliges Target war. Daher handelt es sich bei dem Crosstalk zwischen AhR und Nrf2 nicht um einen unspezifischen Effekt, sondern vermutlich um eine direkte oder indirekte Interaktion. Die Widersprüchlichkeit zur Studie von *Miao et al.* kann eventuell damit erklärt werden, dass die Autoren der Studie den Maus-*Nrf2*-Promotor in verschiedenen Mauszelllinien untersucht haben und sich die *Nrf2*-Regulation in der Maus von der im Menschen unterscheidet.

Um die Interaktion zwischen AhR und Nrf2 näher zu untersuchen, wurden EMSAs durchgeführt und mittels spezifischer Antikörper gezeigt, dass AhR und Nrf2 fähig sind, sowohl an die XRE-101- bzw. XRE-136- als auch an die ARE-149-Bindungsstelle des *UGT1A10*-Promotors zu binden (siehe 3.2.9). Theoretisch ist es auch möglich, dass beide Transkriptionsfaktoren miteinander kompetitieren. Dann würde Nrf2 direkt und ohne AhR an XRE und AhR direkt und ohne Nrf2 an ARE binden. Jedoch sind die Bindungsmotive der Transkriptionsfaktoren unter Säugetieren hoch konserviert und es ist unwahrscheinlich, dass die Bindungsspezifität innerhalb der *UGT*-Gene verloren gegangen ist.

In einer anderen Studie, die sich mit der Untersuchung der murinen Glutathion S-Transferase A1 (*Gsta1*) befasste, wurde hypothetisiert, dass eine koordinierte Regulation von AhR und Nrf2 durch physikalische Interaktion oder durch ein Adapterprotein existieren könnte (154). Um aufzuklären, wie genau die Interaktion zwischen AhR und Nrf2 stattfindet, bedarf es allerdings weiterer Untersuchungen.

Die Ergebnisse sind wichtig, um zu verstehen, wie die metabolische Abwehr gegen Xenobiotika und oxidativen Stress reguliert wird. Nrf2 ist aufgrund der Aktivierung von Detoxifizierungsgenen essentiell für die Zytoprotektion und die Pathogenese von Toxizitätsreaktionen und Entzündungskrankheiten. Diese Aktivierung bestimmt über die Empfänglichkeit gegenüber oxidativen und chemisch induzierten Schäden. Xenobiotika aktivieren den AhR-Pathway, der den Metabolismus von CYPs, aber auch den von detoxifizierenden Enzymen wie UGTs reguliert (31,32,155). Für die zelluläre Redox-Homöostase ist eine Balance zwischen oxidativem Metabolismus und Detoxifizierung (z.B. Glukuronidierung) entscheidend. Gemäß den Ergebnissen dieser Arbeit kann *UGT1A10*, das in der Mukosa des Verdauungstraktes ständig Xenobiotika ausgesetzt ist, entweder direkt durch Xenobiotika via XRE-Bindungsstellen oder indirekt durch ROS-generierten oxidativen Stress via ARE-Bindungselementen reguliert werden. Auf diesem Weg beeinflusst sowohl die AhR- als auch die Nrf2

vermittelte Signaltransduktion die Detoxifizierung durch Glukuronidierung. Der koordinierte Einfluss auf diesen entscheidenden Mechanismus der zellulären Abwehr ist biologisch sinnvoll und die Ergebnisse liefern eine wichtige Verbindung zwischen oxidativem Stress und dem Metabolismus von Xenobiotika sowie Pharmaka. Die Aufklärung der biologischen Mechanismen der zellulären Abwehr ist wichtig für eine zukünftige Entwicklung von spezifischen therapeutischen Strategien, um für die Vorbeugung von entzündlichen und neoplastischen Erkrankungen den oxidativen Stress und damit verbundene Zellschäden zu modulieren.

4.3. Kaffee als Modulator der Glukuronidierungsaktivität und seine Bedeutung für das Gilbert-Meulengracht-Syndrom und eine HCC-Entwicklung

Im Jahr 2006 konsumierte jeder Deutsche durchschnittlich 3,1 Tassen Kaffee pro Tag. Damit ist Kaffee neben Wasser das beliebteste Getränk in Deutschland. Es wurde bereits in vielen Studien gezeigt, dass Kaffeetrinker ein vermindertes HCC-Risiko und ein vermindertes Risiko für Zirrhose, einem Hauptrisikofaktor im Prozess der Leberkarzinogenese, haben (113-116). Ein Grund für diesen positiven Effekt des Kaffees sieht eine andere Studie darin, dass Kaffee durch die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration über TGF- β 1 den CTGF, der profibrotisch wirkt, stark herunterreguliert (118). Eine andere Theorie basiert auf der Annahme, dass Kaffee detoxifizierende Enzyme induziert, die oxidierte und karzinogene Verbindungen konjugieren und damit ihre Ausscheidung aus dem Körper ermöglichen. Dabei wurde Nrf2 als regulierender Transkriptionsfaktor, der durch bestimmte Substanzen wie Cafestol und Kahweol im Kaffee aktiviert wird, bereits identifiziert (119,128). Ob noch andere Transkriptionsfaktoren an der Induktion von Phase II Enzymen beteiligt sind wurde allerdings bis heute nicht aufgeklärt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Promotoren aller getesteten *UGT1A*-Gene (*UGT1A1*, *UGT1A3*, *UGT1A4*, *UGT1A7*, *UGT1A8*, *UGT1A9* und *UGT1A10*) im Luciferase-Assay durch Kaffee induzierbar sind (siehe 3.3.1). Weiterhin wurde nicht nur auf Transkriptionsebene, sondern auch auf Protein-Level anhand von *UGT1A1* gezeigt, dass die Menge an *UGT1A*-Protein durch die Kaffee-Behandlung in den Zellen ansteigt (Abb.27). Die Kaffee vermittelte Induktion konnte zum einen in verschiedenen Zelllinien (HepG2, CaCo2 und KYSE70) nachgewiesen werden und zum anderen wurde gezeigt, dass die Induktion unabhängig

von der Präsenz von Koffein war. In der Studie von *Gressner et al.* wird Paraxanthin, ein Koffeinmetabolit, für die Inhibition des profibrogenen CTGF verantwortlich gemacht (156). Demnach hätten nur diejenigen ein vermindertes Risiko für eine Fibrose, die koffeinhaltigen Kaffee trinken. Verlässliche Studien, die zwischen koffeinhaltigem und entkoffeiniertem Kaffee unterscheiden, gibt es jedoch nicht. Um definitiv auszuschließen, dass die Kaffeeinduktion der UGTs durch Koffein oder eines seiner primären Methylxanthinmetabolite vermittelt wird, wurden die Zellen entweder mit Koffein, Paraxanthin, Theobromin oder Theophyllin behandelt. Es zeigte sich durch die Behandlung allerdings keine UGT1A-Induktion, die dem Ausmaß der Induktion nach Kaffeebehandlung entsprochen hätte (siehe 3.3.4). Außerdem wurde eine Cafestol+Kahweol vermittelte Induktion in unserem Zellkultursystem ausgeschlossen, auch wenn in einer anderen Studie gezeigt wurde, dass eine Cafestol+Kahweol abhängige Induktion von NQO1 in Mausfibroblasten durch ARE-Bindungsstellen vermittelt wird (128), die auch in vielen *UGT1A*-Promotoren zu finden sind. Um die verantwortliche Substanz aus den mehr als tausend verschiedenen im Kaffee enthaltenen Verbindungen herauszufinden, sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig. Ein vielversprechender Kandidat wäre dabei das Melanoidin, das zu den Röststoffen gehört, und bis zu 25% der Trockenmasse eines gebrühten Kaffees ausmacht (129,130). Es wäre eventuell möglich, dass die stark stickstoffhaltigen und hochpolymeren Melanoidine den Aryl Hydrocarbon Rezeptor aktivieren und darüber die *UGT1A*-Transkription heraufregulieren können.

Wie unsere Ergebnisse zeigen, spielt auch die Art des Kaffees und die Zubereitungsart eine wichtige Rolle für die Aktivierung der verschiedenen *UGT1A*-Gene. Durch die Behandlung mit koffeinhaltigem und entkoffeiniertem Filterkaffee wurde eine ähnlich hohe Induktion erzielt, während der mit demselben Kaffeepulver hergestellte French Press Kaffee (durch ein Metallsieb gefiltert) *UGT1A7* und *UGT1A10* sehr viel stärker heraufregulieren konnte (siehe 3.3.3). Die Behandlung mit Instant Kaffee derselben Herstellerfirma führte bei *UGT1A1* und *UGT1A7* zu einer mit Filterkaffee vergleichbaren Induktion, bei *UGT1A10* jedoch zu einer viel höheren Induktion. Zu den weiteren häufig in der Bevölkerung konsumierten Getränken gehören grüner und schwarzer Tee sowie Kakao, denen auch eine antioxidative oder gar antikarzinogene Wirkung zugeschrieben wird (131-133,138,140-143). Die Zubereitungsart vom Kakao ähnelt sehr der vom Kaffee, zumindest bezüglich der Röstung der Bohnen. Jedoch konnte ausschließlich für *UGT1A10* eine signifikante Induktion durch Kakao

nachgewiesen werden, die sogar das Ausmaß der Kaffeeinduktion weit überschritt. Während der schwarze Tee ausschließlich bei *UGT1A10* eine relativ kleine, aber dennoch signifikante Induktion (3-fach) erzielte, wurden alle getesteten *UGT1A*-Promotoren durch grünen Tee induziert.

Die *UGT1A1*28*-Variante zeigte im Luciferase-Assay keine signifikante Reduktion der Kaffee- und Teeinduktion (Abb.29). Dies ist von großer Bedeutung für Patienten, die das Gilbert-Meulengracht-Syndrom aufweisen, da auch sie nach den hier gewonnenen Ergebnissen in der Lage sein müssten, ihre um 70% reduzierte *UGT1A1*-Transkription durch den Konsum von Kaffee signifikant zu steigern. Dazu im Gegensatz ist die Kaffee-Induzierbarkeit der *UGT1A7*12*-Variante im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert (Abb.30). *UGT1A7* spielt eine äußerst wichtige Rolle in der Detoxifizierung von Mutagenen. Individuen, die den hier getesteten Promotorpolymorphismus in Verbindung mit einigen Polymorphismen im Exonbereich tragen (*UGT1A7*3*), haben ein erhöhtes Risiko an HCC zu erkranken (65). Die Träger einer *UGT1A7*-Variante, die aufgrund des Promotorpolymorphismus eine um 70% reduzierte *UGT1A7*-Transkription aufweisen, könnten demnach ihre *UGT1A7*-Expression nicht durch Kaffee heraufregulieren.

Da sowohl für den Kaffee als auch für grünen Tee und Kakao bereits gezeigt wurde, dass sie bzw. ihre Inhaltsstoffe den Transkriptionsfaktor Nrf2 aktivieren, wurden die *UGT1A1*- und *UGT1A7*-Promotoren auf potentielle ARE-Bindungsstellen untersucht. Diese und die bereits oben beschriebene ARE-149-Bindungsstelle im *UGT1A10*-Promotor wurden mutagenisiert, um zu untersuchen, ob durch sie die Kaffeeinduktion vermittelt wird. Weiterhin wurden diverse XRE-Bindungsstellen auf ihre Funktionalität in Verbindung mit einer Kaffeebehandlung untersucht, da es sich bei Kaffee um Xenobiotikum handelt und die Regulation über XREs daher sehr sinnvoll erschien. Die Ergebnisse zeigten, dass die *UGT1A*-Induktion sowohl via AREs als auch über XREs vermittelt wird (siehe 3.3.5). SiRNA-Experimente offenbarten weiterhin, dass sowohl der Transkriptionsfaktor AhR als auch der Transkriptionsfaktor Nrf2 für eine Kaffee vermittelte *UGT1A*-Induktion präsent sein muss (siehe 3.3.6). Auch in den durchgeführten Western Blots konnte sowohl eine Aktivierung von AhR als auch eine von Nrf2 durch Kaffee in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden (siehe 3.3.8). Im Gegensatz dazu steht eine Studie, in der man DBA/2O-Mäusen, denen ein funktioneller AhR fehlt, Kaffee zu trinken gab und das Phase II Enzym NQO1 trotzdem heraufreguliert wurde (128). In der Maus scheint demnach die Kaffee

vermittelte Induktion unabhängig vom Vorhandensein von AhR zu sein. Inwieweit diese Ergebnisse auch auf den Menschen zutreffen bleibt jedoch ungeklärt.

Um zu untersuchen, ob die Kaffee vermittelte Induktion der *UGT1A*-Transkription abhängig vom Zelltyp war, wurden verschiedene Zelllinien (HepG2, CaCo2 und KYSE70) mit Kaffee und entkoffeiniertem Kaffee behandelt und die mRNA-Level mittels real-time-PCR analysiert. Es zeigte sich, dass die *UGT1A1*-mRNA in jeder untersuchten Zelllinie am stärksten durch Kaffee induziert wurde (18 bis 29-fach; siehe 3.3.7), wobei die höchste Heraufregulierung in CaCo2-Zellen erreicht wurde. *UGT1A10*, das natürlicherweise exklusiv extrahepatisch exprimiert wird, konnte in der Leberkarzinomzelllinie (HepG2) durch Kaffeebehandlung lediglich 1,8-fach induziert werden, während der *UGT1A10*-mRNA-Level in der Kolonkarzinomzelllinie 6-fach angehoben wurde. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die *UGT1A*-Induzierbarkeit durch Kaffee nicht nur von der Kaffeesorte und Zubereitungsart sowie vom einzelnen *UGT1A*-Gen, sondern auch vom jeweiligen Zelltyp abhängt. Demnach kann ein konsumierter Kaffee in verschiedenen Zelltypen die Transkription verschiedener *UGT1A*-Isoformen und die damit verbundene Glukuronidierungsaktivität unterschiedlich modulieren.

Um die Heraufregulierung von humanen UGTs auch *in vivo* zu untersuchen, wurde humanisierten transgenen *UGT1A-WT*-Mäusen für drei Tage Kaffee anstelle von Wasser zu trinken gegeben. Die Analyse der RNA zeigte, dass die Transkription des humanen *UGT1A1*-Gens durch den Konsum von Kaffee in männlichen und weiblichen Mäusen in der Leber im Vergleich zu Wasser trinkenden Mäusen stark heraufreguliert wurde (siehe 3.3.9). Dahingegen wurde die *UGT1A3*- und *UGT1A4*-Transkription im Jejunum durch Kaffee nur in männlichen transgenen *UGT1A-WT*-Mäusen um ein Vielfaches erhöht, während die Kaffeeinduktion in Weibchen nicht signifikant war (Abb.44). Ein ähnliches Phänomen zeigte sich auch im Kolon, wo *UGT1A3* und *UGT1A6* ausschließlich in Männchen durch Kaffee induziert werden konnten (Abb.45). Diese geschlechtsspezifischen Unterschiede in der *UGT1A*-Induzierbarkeit durch Kaffee lassen sich eventuell durch die verschiedenen Sexualhormon-Level in Männchen und Weibchen erklären. In der Tat wurde bereits beschrieben, dass *UGT1A4* und *UGT1A10* durch den Östrogen-Rezeptor reguliert werden (157,158).

Im Magen der Kaffee trinkenden transgenen *UGT1A-WT*-Mäuse zeigte sich die stärkste Induktion der *UGT1A*-Transkription. In sowohl männlichen als auch in weiblichen Tieren wurde die Transkription von *UGT1A1*, *UGT1A4* und *UGT1A6* durch

Kaffeeconsum stark heraufreguliert (Abb.46). Da der Magen im Gastrointestinaltrakt das Organ mit dem ersten Kontakt zu aus der Umwelt aufgenommenen Xenobiotika darstellt, ist es durchaus biologisch sinnvoll, dass die *UGT1A*-Transkription schon hier stark heraufreguliert wird. Damit können karzinogene Substanzen direkt im Magen metabolisiert und für die Ausscheidung vorbereitet werden, bevor sie zelluläre Schäden verursachen können. Diejenigen Substanzen, die dennoch den Magen passieren und weiter in den Darm transportiert werden, können dort durch Darm-spezifisch exprimierte UGTs glukuronidiert werden, die zumindest in Männchen auch im Darm durch den Kaffee heraufreguliert werden. Da in der Leber die *UGT1A1*-Transkription induziert wird, können auch viele *UGT1A1*-spezifische Substrate wie die Medikamente Irinotecan, Gemfibrozil, aber auch die karzinogenen PhIP- und BaP-Verbindungen durch einen Kaffeeconsum vermehrt entgiftet werden. Ebenso ist die *in vivo*-Induktion von *UGT1A1* entscheidend für die Hypothese, dass Patienten mit dem Gilbert-Meulengracht-Syndrom ihre reduzierte Bilirubin-Glukuronidierung durch den Konsum von Kaffee ausgleichen könnten, was eine einfache, kostengünstige und nicht-toxische Methode der Modulierung der Glukuronidierungsaktivität darstellen würde. Besondere relevant wäre diese Methode für die Träger eines *UGT1A*-Haplotypen (*UGT1A1**28, *UGT1A7**3 und *UGT1A7**12), die bei Irinotecanbehandlung eine erhöhte Toxizität des Zytostatikums aufweisen (48). Da nach den Ergebnissen dieser Arbeit die Präsenz von Koffein nicht für eine *UGT1A*-Induktion erforderlich ist, wäre der Genuss von Kaffee auch ohne die möglicherweise unerwünschten Nebenwirkungen von Koffein (Blutdruckerhöhung, Schlafstörungen, Kurzatmigkeit, Zitteranfälle) zur Erhöhung der Glukuronidierungsaktivität effektiv.

4.4 Vergleich der *UGT1A*-Transkriptvarianten-Verteilung in Mensch und in der humanisierten *tgUGT1A*-Maus und der Einfluss von SNPs auf die Expression von *UGT1A*-Transkriptvarianten

In der Studie von *Girard et al.* wurde ein neu entdeckter Splicing-Mechanismus beschrieben, bei dem es zur Herstellung von drei verschiedenen Transkriptvarianten pro *UGT1A*-Gen kommt (24). Da die Translation von Transkript v2 und v3 zur Herstellung eines identischen Proteins führt, ergeben sich daraus neun neu entdeckte *UGT1A*-Proteine (eines pro *UGT1A*-Gen), die nach *Girard et al.* eine inhibitorische

Wirkung auf die Glukuronidierungsaktivität der ursprünglichen UGT1A-Proteine (die vom Transkript v1 translatiert werden) ausüben. Die Frage, wie die Transkription der unterschiedlichen Transkripte reguliert wird, wurde innerhalb der Studie allerdings nicht geklärt.

Die Verteilung der verschiedenen UGT1A-Transkripte in der *tgUGT1A-WT*-Maus ist der Verteilung im Menschen sehr ähnlich, zum Teil gibt es aber auch Unterschiede (siehe 3.4). So wird UGT1A_v1 in der humanen Leber sowie in der transgenen Maus etwa gleich stark wie die Transkriptvariante UGT1A1_v2 exprimiert. Im Allgemeinen wird die Variante v2 im humanen Gewebe schwächer exprimiert als die Variante v1, was auch in der humanisierten *tgUGT1A-WT*-Maus der Fall ist. Dennoch konnten *UGT1A6* und *UGT1A9*, die im Menschen konstitutiv in der Leber exprimiert werden, in der Maus mit Hilfe der gewählten Primer (aus der Studie von *Girard et al.* (24)) nicht detektiert werden. Dieser Befund kann am ehesten methodisch, durch die Wahl der Primer oder der gewählten Bedingungen für die konventionelle PCR erklärt werden, da in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Strassburg mittels real-time-PCR bei der Charakterisierung der transgenen *UGT1A-WT/SNP*-Mauslinie sowohl die Expression von UGT1A6 als auch die von UGT1A9 sicher in der Leber nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Gleiches gilt für die Expression von *UGT1A7*, dessen Transkriptvarianten mit Hilfe der PCR nach *Girard et al.* in keinem untersuchten Organ detektiert werden konnte. Mittels real-time-PCR in Vorarbeiten wurde die UGT1A7-mRNA in hohen Leveln im Magen der transgenen *UGT1A-WT*-Maus nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Die in dieser Arbeit detektierten Expressionslevel der UGT1A-Transkriptvarianten v1 und v2/3 unterschieden sich in der *tgUGT1A-SNP*-Maus teilweise enorm im Vergleich zu denen in der *tgUGT1A-WT*-Maus. Im Allgemeinen wurden die Transkriptvarianten in der *tgUGT1A-SNP*-Maus sehr viel geringer exprimiert als in der *tgUGT1A-WT*-Maus. So wurde die Variante UGT1A1_v1 in der Leber fast 5-mal und UGT1A1_v2/3 ca. 3-mal schwächer in der *tgUGT1A-SNP*-Maus exprimiert. Damit haben die Polymorphismen nicht nur einen Einfluss auf die Gesamttranskriptmenge, sondern auch auf das Verhältnis der Expressionslevel zwischen v1 und v2/3. Die *UGT1A4*-Expression konnte in der Leber der *tgUGT1A-SNP*-Maus sogar gar nicht detektiert werden, während die Variante UGT1A4_v1 in der Leber der *tgUGT1A-WT*-Maus sehr hoch exprimiert wurde. Als Sonderfall kann die *UGT1A1*-Expression im Magen angesehen werden. In diesem Fall wurde ausschließlich eine Expression von

UGT1A1_v1 und v2/3 Expression in den *tgUGT1A-SNP*-Mäusen und nicht in den *tgUGT1A-WT*-Mäusen detektiert. Demnach scheinen die im transgenen *UGT1A*-Lokus vorhandenen Polymorphismen dafür verantwortlich zu sein, dass *UGT1A1*, das im Menschen normalerweise nicht im Magen exprimiert wird, in den *tgUGT1A-SNP*-Mäusen in einem relativ hohen Level exprimiert wird.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass Polymorphismen einen starken Einfluss auf die Regulation der Transkription haben. Sie sind fähig, die Expression einzelner *UGT1A*-Isoformen herunterzuregulieren, sind aber auch im Stande, die Transkription einer *UGT1A*-Isoform in einem Organ zu aktivieren, in dem sie normalerweise nicht exprimiert wird. Weiterhin können Polymorphismen das Expressions-Verhältnis von v1- zu v2/3-Transkripten verändern und damit das Ausmaß der inhibitorischen Aktivität der vom Transkript v2 translatierten *UGT1A*-Proteine modulieren.

Literaturverzeichnis

1. Carriere, V., Chambaz, J., and Rousset, M. (2001) *Toxicol In Vitro* **15**(4-5), 373-378
2. Liska, D. J. (1998) *Altern Med Rev* **3**(3), 187-198
3. Dhakshinamoorthy, S., Long, D. J., 2nd, and Jaiswal, A. K. (2000) *Curr Top Cell Regul* **36**, 201-216
4. Jaiswal, A. K. (2000) *Free Radic Biol Med* **29**(3-4), 254-262
5. Goetz, M. E., and Luch, A. (2008) *Cancer Lett* **266**(1), 73-83
6. Strassburg, C. P., Manns, M. P., and Tukey, R. H. (1997) *Cancer Res* **57**(14), 2979-2985
7. Ward, J. F. (1994) *Int J Radiat Biol* **66**(5), 427-432
8. Auten, R. L., O'Reilly, M. A., Oury, T. D., Nozik-Grayck, E., and Whorton, M. H. (2006) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**(1), L32-40
9. Ho, Y. S., Xiong, Y., Ma, W., Spector, A., and Ho, D. S. (2004) *J Biol Chem* **279**(31), 32804-32812
10. Koo, H. C., Davis, J. M., Li, Y., Hatzis, D., Opsimos, H., Pollack, S., Strayer, M. S., Ballard, P. L., and Kazzaz, J. A. (2005) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**(4), L718-726
11. Holtzclaw, W. D., Dinkova-Kostova, A. T., and Talalay, P. (2004) *Adv Enzyme Regul* **44**, 335-367
12. Dutton, G. J. (1980) *Glucuronidation of drugs and other compounds*, CRC Boca Raton Press, Boca Raton, FL
13. Mojarrabi, B., and Mackenzie, P. I. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **247**(3), 704-709
14. Strassburg, C. P., Manns, M. P., and Tukey, R. H. (1998) *J Biol Chem* **273**(15), 8719-8726
15. Hanioka, N., Ozawa, S., Jinno, H., Ando, M., Saito, Y., and Sawada, J. (2001) *Xenobiotica* **31**(10), 687-699
16. Lankisch, T. O., Moebius, U., Wehmeier, M., Behrens, G., Manns, M. P., Schmidt, R. E., and Strassburg, C. P. (2006) *Hepatology* **44**(5), 1324-1332
17. Mackenzie, P. I., Owens, I. S., Burchell, B., Bock, K. W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D. W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Chowdhury, J. R., Ritter, J. K., Schachter, H., Tephly, T. R., Tipton, K. F., and Nebert, D. W. (1997) *Pharmacogenetics* **7**(4), 255-269
18. Gong, Q. H., Cho, J. W., Huang, T., Potter, C., Gholami, N., Basu, N. K., Kubota, S., Carvalho, S., Pennington, M. W., Owens, I. S., and Popescu, N. C. (2001) *Pharmacogenetics* **11**(4), 357-368.
19. Strassburg, C. P., Kalthoff, S., and Ehmer, U. (2008) *Crit Rev Clin Lab Sci* **45**(6), 485-530
20. Meech, R., and Mackenzie, P. I. (1998) *Arch Biochem Biophys* **356**(1), 77-85
21. Radomska-Pandya, A., Ouzzine, M., Fournel-Gigleux, S., and Magdalou, J. (2005) *Methods Enzymol* **400**, 116-147
22. Meech, R., and Mackenzie, P. I. (1997) *Clin Exp Pharmacol Physiol* **24**(12), 907-915
23. Levesque, E., Girard, H., Journault, K., Lepine, J., and Guillemette, C. (2007) *Hepatology* **45**(1), 128-138

24. Girard, H., Levesque, E., Bellemare, J., Journault, K., Caillier, B., and Guillemette, C. (2007) *Pharmacogenet Genomics* **17**(12), 1077-1089
25. Uchaipichat, V., Mackenzie, P. I., Guo, X. H., Gardner-Stephen, D., Galetin, A., Houston, J. B., and Miners, J. O. (2004) *Drug Metab Dispos* **32**(4), 413-423
26. Ritter, J. K., Crawford, J. M., and Owens, I. S. (1991) *J Biol Chem* **266**(2), 1043-1047
27. Strassburg, C. P., Nguyen, N., Manns, M. P., and Tukey, R. H. (1998) *Mol Pharmacol* **54**(4), 647-654
28. Strassburg, C. P., Strassburg, A., Nguyen, N., Li, Q., Manns, M. P., and Tukey, R. H. (1999) *Biochem J* **338**(Pt 2), 489-498
29. Strassburg, C. P., Kneip, S., Topp, J., Obermayer-Straub, P., Barut, A., Tukey, R. H., and Manns, M. P. (2000) *J Biol Chem* **275**, 36164-36171
30. Gardner-Stephen, D. A., and Mackenzie, P. I. (2006) *Drug Metab Dispos*
31. Lankisch, T. O., Gillman, T. C., Erichsen, T. J., Ehmer, U., Kalthoff, S., Freiberg, N., Munzel, P. A., Manns, M. P., and Strassburg, C. P. (2008) *Arch Toxicol* **82**(9), 573-582
32. Erichsen, T. J., Ehmer, U., Kalthoff, S., Lankisch, T. O., Muller, T. M., Munzel, P. A., Manns, M. P., and Strassburg, C. P. (2008) *Toxicol Appl Pharmacol* **230**(2), 252-260
33. Ramirez, J., Mirkov, S., Zhang, W., Chen, P., Das, S., Liu, W., Ratain, M. J., and Innocenti, F. (2007) *Pharmacogenomics J*
34. Yueh, M. F., Bonzo, J. A., and Tukey, R. H. (2005) *Methods Enzymol* **400**, 75-91
35. Yueh, M. F., and Tukey, R. H. (2007) *J Biol Chem* **282**(12), 8749-8758
36. Gregory, P. A., Lewinsky, R. H., Gardner-Stephen, D. A., and Mackenzie, P. I. (2004) *Mol Pharmacol* **65**(4), 953-963.
37. Bosma, P. J., Seppen, J., Goldhoorn, B., Bakker, C., Oude Elferink, R. P., Chowdhury, J. R., Chowdhury, N. R., and Jansen, P. L. (1994) *J Biol Chem* **269**(27), 17960-17964
38. Tukey, R. H., and Strassburg, C. P. (2000) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 581-616
39. Fang, J. L., and Lazarus, P. (2004) *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**(1), 102-109
40. Ritter, J. K., Yeatman, M. T., Ferreira, P., and Owens, I. S. (1992) *J Clin Invest* **90**(1), 150-155
41. Aono, S., Yamada, Y., Keino, H., Sasaoka, Y., Nakagawa, T., Onishi, S., Mimura, S., Koiwai, O., and Sato, H. (1994) *Pediatr Res* **35**(6), 629-632
42. Bosma, P. J., Goldhoorn, B., Oude Elferink, R. P., Sinaasappel, M., Oostra, B. A., and Jansen, P. L. (1993) *Gastroenterology* **105**(1), 216-220
43. Aono, S., Yamada, Y., Keino, H., Hanada, N., Nakagawa, T., Sasaoka, Y., Yazawa, T., Sato, H., and Koiwai, O. (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **197**(3), 1239-1244
44. Bosma, P. J., Chowdhury, J. R., Bakker, C., Gantla, S., de Boer, A., Oostra, B. A., Lindhout, D., Tytgat, G. N., Jansen, P. L., Oude Elferink, R. P., and et al. (1995) *N Engl J Med* **333**(18), 1171-1175
45. Strassburg, C. P. (2008) *Pharmacogenomics* **9**(6), 703-715
46. Burchell, B., and Hume, R. (1999) *J Gastroenterol Hepatol* **14**(10), 960-966
47. Tang, K. S., Chiu, H. F., Chen, H. H., Eng, H. L., Tsai, C. J., Teng, H. C., and Huang, C. S. (2005) *World J Gastroenterol* **11**(21), 3250-3254

48. Lankisch, T. O., Schulz, C., Zwingers, T., Erichsen, T. J., Manns, M. P., Heinemann, V., and Strassburg, C. P. (2008) *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**(3), 695-701
49. Lankisch, T. O., Behrens, G., Ehmer, U., Mobius, U., Rockstroh, J., Wehmeier, M., Kalthoff, S., Freiberg, N., Manns, M. P., Schmidt, R. E., and Strassburg, C. P. (2009) *J Hepatol* **50**(5), 1010-1018
50. Fang, J. L., Beland, F. A., Doerge, D. R., Wiener, D., Guillemette, C., Marques, M. M., and Lazarus, P. (2002) *Cancer Res* **62**(7), 1978-1986
51. Malfatti, M. A., and Felton, J. S. (2004) *Chem Res Toxicol* **17**(8), 1137-1144
52. Lankisch, T. O., Vogel, A., Eilermann, S., Fiebeler, A., Krone, B., Barut, A., Manns, M. P., and Strassburg, C. P. (2005) *Mol Pharmacol* **67**(5), 1732-1739
53. Ciotti, M., Basu, N., Brangi, M., and Owens, I. S. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **260**(1), 199-202
54. La Vecchia, C., D'Avanzo, B., Airoldi, L., Braga, C., and Decarli, A. (1995) *Eur J Cancer Prev* **4**(6), 469-474
55. Kadlubar, F. F. (1991) Carcinogenic aromatic amine metabolism and DNA adduct detection in humans. In: Ernster, L., Esumi, H., Fujii, Z., Gelboin, H. V., Kato, R., and Sugimura, T. (eds). *Xenobiotics and Cancer: Implications for chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy*, Japan Scientific Press, Tokyo
56. Esumi, H., Ohgaki, H., Kohzen, E., Takayama, S., and Sugimura, T. (1989) *Jpn J Cancer Res* **80**(12), 1176-1178
57. Wakabayashi, K., Nagao, M., Esumi, H., and Sugimura, T. (1992) *Cancer Res* **52**(7 Suppl), 2092s-2098s
58. Kuper, H., Tzonou, A., Kaklamani, E., Hsieh, C. C., Lagiou, P., Adami, H. O., Trichopoulos, D., and Stuver, S. O. (2000) *Int J Cancer* **85**(4), 498-502
59. Bock, K. W. (1991) *Crit Rev Biochem Mol Biol* **26**(2), 129-150
60. el Mouelhi, M., Didolkar, M. S., Elias, E. G., Guengerich, F. P., and Kauffman, F. C. (1987) *Cancer Res* **47**(2), 460-466
61. Fischer, G., Schauer, A., Hartmann, H., and Bock, K. W. (1985) *Naturwissenschaften* **72**(5), 277-278
62. Hu, Z., and Wells, P. G. (1994) *Toxicol Appl Pharmacol* **127**(2), 306-313
63. Nowell, S. A., Massengill, J. S., Williams, S., Radominska-Pandya, A., Tephly, T. R., Cheng, Z., Strassburg, C. P., Tukey, R. H., MacLeod, S. L., Lang, N. P., and Kadlubar, F. F. (1999) *Carcinogenesis* **20**(6), 1107-1114
64. Vienneau, D. S., DeBoni, U., and Wells, P. G. (1995) *Cancer Res* **55**(5), 1045-1051
65. Tseng, C. S., Tang, K. S., Lo, H. W., Ker, C. G., Teng, H. C., and Huang, C. S. (2005) *Am J Gastroenterol* **100**(8), 1758-1763
66. Cheng, Z., Radominska-Pandya, A., and Tephly, T. R. (1998) *Arch Biochem Biophys* **356**(2), 301-305
67. Huang, Y. H., Galijatovic, A., Nguyen, N., Geske, D., Beaton, D., Green, J., Green, M., Peters, W. H., and Tukey, R. H. (2002) *Pharmacogenetics* **12**(4), 287-297.
68. Van Der Logt, E. M., Bergevoet, S. M., Roelofs, H. M., Van Hooijdonk, Z., Te Morsche, R. H., Wobbes, T., De Kok, J. B., Nagengast, F. M., and Peters, W. H. (2004) *Carcinogenesis* **19**, 19
69. Ehmer, U., Vogel, A., Schutte, J. K., Krone, B., Manns, M. P., and Strassburg, C. P. (2004) *Hepatology* **39**(4), 970-977.
70. Verlaan, M., Drenth, J. P., Truninger, K., Koudova, M., Schulz, H. U., Bargetzi, M., Kunzli, B., Friess, H., Cerny, M., Kage, A., Landt, O., te Morsche, R. H.,

- Rosendahl, J., Luck, W., Nickel, R., Halangk, J., Becker, M., Macek, M., Jr., Jansen, J. B., and Witt, H. (2005) *J Med Genet* **42**(10), e62
71. Bernard, O., and Guillemette, C. (2004) *Drug Metab Dispos* **32**(8), 775-778
72. Shipkova, M., Strassburg, C. P., Braun, F., Streit, F., Grone, H. J., Armstrong, V. W., Tukey, R. H., Oellerich, M., and Wieland, E. (2001) *Br J Pharmacol* **132**(5), 1027-1034.
73. Girard, H., Villeneuve, L., Court, M. H., Fortier, L. C., Caron, P., Hao, Q., von Moltke, L. L., Greenblatt, D. J., and Guillemette, C. (2006) *Drug Metab Dispos* **34**(7), 1220-1228
74. Albert, C., Vallee, M., Beaudry, G., Belanger, A., and Hum, D. W. (1999) *Endocrinology* **140**(7), 3292-3302
75. Yueh, M. F., Nguyen, N., Famourzadeh, M., Strassburg, C. P., Oda, Y., Guengerich, F. P., and Tukey, R. H. (2001) *Carcinogenesis* **22**(6), 943-950.
76. Villeneuve, L., Girard, H., Fortier, L. C., Gagne, J. F., and Guillemette, C. (2003) *J Pharmacol Exp Ther* **307**(1), 117-128. Epub 2003 Aug 2027.
77. Saeki, M., Saito, Y., Jinno, H., Sai, K., Komamura, K., Ueno, K., Kamakura, S., Kitakaze, M., Shirao, K., Minami, H., Ohtsu, A., Yoshida, T., Saijo, N., Ozawa, S., and Sawada, J. (2003) *Drug Metab Pharmacokinet* **18**(2), 146-149
78. Baldelli, S., Merlini, S., Perico, N., Nicastri, A., Cortinovis, M., Gotti, E., Remuzzi, G., and Cattaneo, D. (2007) *Pharmacogenomics* **8**(9), 1127-1141
79. Strassburg, C. P., Oldhafer, K., Manns, M. P., and Tukey, R. H. (1997) *Mol Pharmacol* **52**(2), 212-220
80. Zheng, Z., Fang, J. L., and Lazarus, P. (2002) *Drug Metab Dispos* **30**(4), 397-403
81. Dellinger, R. W., Chen, G., Blevins-Primeau, A. S., Krzeminski, J., Amin, S., and Lazarus, P. (2007) *Carcinogenesis* **28**(11), 2412-2418
82. Boersma, M. G., van der Woude, H., Bogaards, J., Boeren, S., Vervoort, J., Cnubben, N. H., van Iersel, M. L., van Bladeren, P. J., and Rietjens, I. M. (2002) *Chem Res Toxicol* **15**(5), 662-670
83. Lee, H. S., Ji, H. Y., Park, E. J., and Kim, S. Y. (2007) *Xenobiotica* **37**(8), 803-817
84. Mojarrabi, B., and Mackenzie, P. I. (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **238**(3), 775-778
85. Takenaga, N., Ishii, M., Kamei, T., and Yasumori, T. (2002) *Drug Metab Dispos* **30**(5), 494-497
86. Jeong, E. J., Liu, Y., Lin, H., and Hu, M. (2005) *Drug Metab Dispos* **33**(6), 785-794
87. Kemp, D. C., Fan, P. W., and Stevens, J. C. (2002) *Drug Metab Dispos* **30**(6), 694-700
88. Watanabe, Y., Nakajima, M., and Yokoi, T. (2002) *Drug Metab Dispos* **30**(12), 1462-1469
89. Alonen, A., Aitio, O., Hakala, K., Luukkanen, L., Finel, M., and Kostianen, R. (2005) *Drug Metab Dispos* **33**(5), 657-663
90. Sten, T., Qvisen, S., Uutela, P., Luukkanen, L., Kostianen, R., and Finel, M. (2006) *Drug Metab Dispos* **34**(9), 1488-1494
91. Starlard-Davenport, A., Xiong, Y., Bratton, S., Gallus-Zawada, A., Finel, M., and Radomska-Pandya, A. (2007) *Steroids* **72**(1), 85-94
92. Starlard-Davenport, A., Lyn-Cook, B., and Radomska-Pandya, A. (2008) *Steroids* **73**(6), 611-620
93. Elahi, A., Bendaly, J., Zheng, Z., Muscat, J. E., Richie, J. P., Jr., Schantz, S. P., and Lazarus, P. (2003) *Cancer* **98**(4), 872-880

94. Saeki, M., Ozawa, S., Saito, Y., Jinno, H., Hamaguchi, T., Nokihara, H., Shimada, Y., Kunitoh, H., Yamamoto, N., Ohe, Y., Yamada, Y., Shirao, K., Muto, M., Mera, K., Goto, K., Ohmatsu, H., Kubota, K., Niho, S., Kakinuma, R., Minami, H., Ohtsu, A., Yoshida, T., Saijo, N., and Sawada, J. (2002) *Drug Metab Pharmacokinet* **17**(5), 488-490
95. Martineau, I., Tchernof, A., and Belanger, A. (2004) *Drug Metab Dispos* **32**(4), 455-459
96. Dellinger, R. W., Fang, J. L., Chen, G., Weinberg, R., and Lazarus, P. (2006) *Drug Metab Dispos* **34**(6), 943-949
97. Breimer, L. H. (1990) *Mol Carcinog* **3**(4), 188-197
98. Yu, X., and Kensler, T. (2005) *Mutat Res* **591**(1-2), 93-102
99. Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (1999) *Genes Dev* **13**(1), 76-86
100. Marini, M. G., Chan, K., Casula, L., Kan, Y. W., Cao, A., and Moi, P. (1997) *J Biol Chem* **272**(26), 16490-16497
101. Nguyen, T., Sherratt, P. J., and Pickett, C. B. (2003) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**, 233-260
102. Venugopal, R., and Jaiswal, A. K. (1998) *Oncogene* **17**(24), 3145-3156
103. Petrulis, J. R., and Perdew, G. H. (2002) *Chem Biol Interact* **141**(1-2), 25-40
104. Whitlock, J. P., Jr. (1990) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **30**, 251-277
105. Munzel, P. A., Schmohl, S., Buckler, F., Jaehrling, J., Raschko, F. T., Kohle, C., and Bock, K. W. (2003) *Biochem Pharmacol* **66**(5), 841-847
106. Yeager, R. L., Reisman, S. A., Aleksunes, L. M., and Klaassen, C. D. (2009) *Toxicol Sci*
107. Miao, W., Hu, L., Scrivens, P. J., and Batist, G. (2005) *J Biol Chem* **280**(21), 20340-20348
108. Bekedam, E. K., Loots, M. J., Schols, H. A., Van Boekel, M. A., and Smit, G. (2008) *J Agric Food Chem* **56**(16), 7138-7145
109. Higdon, J. V., and Frei, B. (2006) *Crit Rev Food Sci Nutr* **46**(2), 101-123
110. van Dam, R. M., Dekker, J. M., Nijpels, G., Stehouwer, C. D., Bouter, L. M., and Heine, R. J. (2004) *Diabetologia* **47**(12), 2152-2159
111. Hernan, M. A., Takkouche, B., Caamano-Isorna, F., and Gestal-Otero, J. J. (2002) *Ann Neurol* **52**(3), 276-284
112. Tavani, A., and La Vecchia, C. (2004) *Cancer Causes Control* **15**(8), 743-757
113. Bravi, F., Bosetti, C., Tavani, A., Bagnardi, V., Gallus, S., Negri, E., Franceschi, S., and La Vecchia, C. (2007) *Hepatology* **46**(2), 430-435
114. Corrao, G., Lepore, A. R., Torchio, P., Valenti, M., Galatola, G., D'Amicis, A., Arico, S., and di Orio, F. (1994) *Eur J Epidemiol* **10**(6), 657-664
115. Corrao, G., Zambon, A., Bagnardi, V., D'Amicis, A., and Klatsky, A. (2001) *Ann Epidemiol* **11**(7), 458-465
116. Gallus, S., Tavani, A., Negri, E., and La Vecchia, C. (2002) *Ann Epidemiol* **12**(3), 202-205
117. Ruhl, C. E., and Everhart, J. E. (2005) *Gastroenterology* **128**(1), 24-32
118. Gressner, O. A., Lahme, B., Rehbein, K., Siluschek, M., Weiskirchen, R., and Gressner, A. M. (2008) *J Hepatol* **49**(5), 758-767
119. Tao, K. S., Wang, W., Wang, L., Cao, D. Y., Li, Y. Q., Wu, S. X., and Dou, K. F. (2008) *Med Hypotheses* **71**(5), 730-736
120. James, J. E. (2004) *Psychosom Med* **66**(1), 63-71
121. Carrillo, J. A., and Benitez, J. (2000) *Clin Pharmacokinet* **39**(2), 127-153
122. Crews, H. M., Olivier, L., and Wilson, L. A. (2001) *Food Addit Contam* **18**(12), 1075-1087

123. Krul, C., and Hageman, G. (1998) *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **709**(1), 27-34
124. Kot, M., and Daniel, W. A. (2008) *Pharmacol Rep* **60**(6), 789-797
125. Iwai, K., Kishimoto, N., Kakino, Y., Mochida, K., and Fujita, T. (2004) *J Agric Food Chem* **52**(15), 4893-4898
126. Feng, R., Lu, Y., Bowman, L. L., Qian, Y., Castranova, V., and Ding, M. (2005) *J Biol Chem* **280**(30), 27888-27895
127. Hwang, Y. P., Yun, H. J., Chun, H. K., Chung, Y. C., Kim, H. K., Jeong, M. H., Yoon, T. R., and Jeong, H. G. (2009) *Chem Biol Interact* **181**(3), 366-376
128. Higgins, L. G., Cavin, C., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J. D. (2008) *Toxicol Appl Pharmacol* **226**(3), 328-337
129. Delgado-Andrade, C., and Morales, F. J. (2005) *J Agric Food Chem* **53**(5), 1403-1407
130. Borrelli, R. C., Visconti, A., Mennella, C., Anese, M., and Fogliano, V. (2002) *J Agric Food Chem* **50**(22), 6527-6533
131. Inoue, M., Tajima, K., Hirose, K., Hamajima, N., Takezaki, T., Kuroishi, T., and Tominaga, S. (1998) *Cancer Causes Control* **9**(2), 209-216
132. Ji, B. T., Chow, W. H., Hsing, A. W., McLaughlin, J. K., Dai, Q., Gao, Y. T., Blot, W. J., and Fraumeni, J. F., Jr. (1997) *Int J Cancer* **70**(3), 255-258
133. Nakachi, K., Suemasu, K., Suga, K., Takeo, T., Imai, K., and Higashi, Y. (1998) *Jpn J Cancer Res* **89**(3), 254-261
134. Chung, F. L. (1999) *Proc Soc Exp Biol Med* **220**(4), 244-248
135. Wei, H., Zhang, X., Zhao, J. F., Wang, Z. Y., Bickers, D., and Lebowitz, M. (1999) *Free Radic Biol Med* **26**(11-12), 1427-1435
136. Na, H. K., and Surh, Y. J. (2006) *Mol Nutr Food Res* **50**(2), 152-159
137. Zhang, Z. M., Yang, X. Y., Yuan, J. H., Sun, Z. Y., and Li, Y. Q. (2009) *Chin Med J (Engl)* **122**(14), 1660-1665
138. Shi, S. T., Wang, Z. Y., Smith, T. J., Hong, J. Y., Chen, W. F., Ho, C. T., and Yang, C. S. (1994) *Cancer Res* **54**(17), 4641-4647
139. Jankun, J., Selman, S. H., Swiercz, R., and Skrzypczak-Jankun, E. (1997) *Nature* **387**(6633), 561
140. Ramiro-Puig, E., and Castell, M. (2009) *Br J Nutr* **101**(7), 931-940
141. Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., and Lee, C. Y. (2003) *J Agric Food Chem* **51**(25), 7292-7295
142. Kimura, S., Warabi, E., Yanagawa, T., Ma, D., Itoh, K., Ishii, Y., Kawachi, Y., and Ishii, T. (2009) *Biochem Biophys Res Commun* **387**(1), 109-114
143. Egger, A. L., Gay, K. A., and Mesecar, A. D. (2008) *Mol Nutr Food Res* **52** Suppl 1, S84-94
144. Sugatani, J., Yamakawa, K., Yoshinari, K., Machida, T., Takagi, H., Mori, M., Kakizaki, S., Sueyoshi, T., Negishi, M., and Miwa, M. (2002) *Biochem Biophys Res Commun* **292**(2), 492-497
145. Urquhart, B. L., Tirona, R. G., and Kim, R. B. (2007) *J Clin Pharmacol* **47**(5), 566-578
146. Venkatraman, M., Konga, D., Peramaiyan, R., Ganapathy, E., and Dhanapal, S. (2008) *Biol Pharm Bull* **31**(9), 1639-1645
147. Reddy, V. P., Zhu, X., Perry, G., and Smith, M. A. (2009) *J Alzheimers Dis* **16**(4), 763-774
148. Segal, B. H., Davidson, B. A., Hutson, A. D., Russo, T. A., Holm, B. A., Mullan, B., Habitzruther, M., Holland, S. M., and Knight, P. R., 3rd. (2007) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**(3), L760-768

149. Videan, E. N., Heward, C. B., Chowdhury, K., Plummer, J., Su, Y., and Cutler, R. G. (2009) *Comp Med* **59**(3), 287-296
150. Itoh, K., Tong, K. I., and Yamamoto, M. (2004) *Free Radic Biol Med* **36**(10), 1208-1213
151. Nguyen, T., Sherratt, P. J., Huang, H. C., Yang, C. S., and Pickett, C. B. (2003) *J Biol Chem* **278**(7), 4536-4541
152. Chan, K., and Kan, Y. W. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(22), 12731-12736
153. Ramos-Gomez, M., Kwak, M. K., Dolan, P. M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., and Kensler, T. W. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(6), 3410-3415
154. Vasiliou, V., Puga, A., Chang, C. Y., Tabor, M. W., and Nebert, D. W. (1995) *Biochem Pharmacol* **50**(12), 2057-2068
155. Quattrochi, L. C., and Tukey, R. H. (1993) *Mol Pharmacol* **43**(4), 504-508
156. Gressner, O. A., Lahme, B., Siluschek, M., and Gressner, A. M. (2009) *Liver Int* **29**(6), 886-897
157. Chen, H., Yang, K., Choi, S., Fischer, J. H., and Jeong, H. (2009) *Drug Metab Dispos* **37**(9), 1841-1847
158. Starlard-Davenport, A., Lyn-Cook, B., and Radomska-Pandya, A. (2008) *Steroids* **73**(1), 139-147

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb.1: Genetische Organisation des humanen UGT1A-Lokus und beispielhafte Transkription des <i>UGT1A4</i> -Gens	4
Abb.2: Herstellung der drei verschiedenen Transkriptvarianten v1, v2 und v3 durch alternatives Splicing	5
Abb.3: Verteilung der spezifischen UGT1A-Transkriptvarianten in humaner Leber, Niere, Kolon, Ösophagus und Dünndarm	6
Abb.4: Schematische Darstellung des humanen UGT1A-Lokus und der hergestellten BAC-Konstrukte	20
Abb.5: Schema der durchgeführten zielgerichteten Mutagenese-PCR	38
Abb.6: Schematische Darstellung der TaqMan PCR	46
Abb.7: Schematische Darstellung des Prinzips des EMSAs	50
Abb.8: Zeitabhängige Regulation der UGT1A10-mRNA durch TCDD (5 nM) und <i>t</i> BHQ (100 µM) im Vergleich zu DMSO in KYSE70-Zellen	57
Abb.9: Zeitabhängige Regulation der <i>UGT1A10</i> -500bp-Promotorregion durch TCDD und <i>t</i> BHQ im Luciferase-Assay in KYSE70-Zellen	57
Abb.10: Luciferase-Reportergen-Assay mit dem <i>UGT1A10</i> -Wildtyp-Promotor-Konstrukt und Konstrukten mit verschiedenen mutagenisierten potentiellen XRE- und ARE-Bindestellen	58
Abb.11: Vergleich der <i>UGT1A8</i> -, <i>UGT1A9</i> - und <i>UGT1A10</i> -Induzierbarkeit durch TCDD und <i>t</i> BHQ im Luciferase-Assay	60
Abb.12: Vergleich der 5'-upstream Sequenzen der <i>UGT1A8</i> -, <i>UGT1A9</i> - und <i>UGT1A10</i> -Gene	60
Abb.13: Einfluss der Mutagenese von XRE- und ARE-Bindestellen im <i>UGT1A8</i> -Promotor auf die TCDD- und <i>t</i> BHQ-Induktion	61
Abb.14: Einfluss der Mutagenese von XRE- und ARE-Bindestellen im <i>UGT1A9</i> -Promotor auf die TCDD- und <i>t</i> BHQ-Induktion	62
Abb.15: Eine gleichzeitige Induktion des <i>UGT1A10</i> -Reportergenkonstruktes mit TCDD und <i>t</i> BHQ im Luciferase-Assay führte zu keinem synergetischen Effekt in KYSE70-Zellen	63
Abb.16: A: Einfluss der Mutagenese der <i>UGT1A10</i> -ARE-Sequenz entsprechend der <i>UGT1A9</i> -ARE-Sequenz auf die TCDD- und <i>t</i> BHQ-Induktion. B: Einfluss der Mutagenese der	

<i>UGT1A9</i> -ARE-Sequenz entsprechend der <i>UGT1A10</i> -ARE-Sequenz auf die TCDD und <i>t</i> BHQ vermittelte Induktion	64
Abb.17: Überprüfung der Effizienz der verwendeten siRNA mittels Western Blot	65
Abb.18: Einfluss des AhR-/Nrf2-Knockdowns auf die <i>UGT1A10</i> -mRNA-Induzierbarkeit durch TCDD und <i>t</i> BHQ	66
Abb.19: Einfluss des siRNA vermittelten Knockdowns von AhR/Nrf2 auf die TCDD-/ <i>t</i> BHQ-Induzierbarkeit von <i>UGT1A10</i> und <i>UGT1A8</i>	66
Abb.20: Einfluss des AhR-/Nrf2-Knockdowns auf die TCDD-/ <i>t</i> BHQ-Induzierbarkeit des <i>UGT1A9</i> -WT-Konstruktes und der des Konstruktes <i>UGT1A9</i> ARE-143 mut like 1A10 „all“	67
Abb.21: Untersuchung der TCDD-/ <i>t</i> BHQ vermittelten Induktion mittels Western Blot.	69
Abb.22: Untersuchung der Spezifität der TCDD/ <i>t</i> BHQ vermittelten Induktion auf AhR-/Nrf2-mRNA-Ebene	69
Abb.23: Kompetitionsversuche für die <i>UGT1A10</i> -XRE-101- und ARE-149-Bindestellen im EMSA	70
Abb.24: Supershift-Experimente für die <i>UGT1A10</i> -XRE-101- und ARE-149-Bindestellen im EMSA	72
Abb.25: Kompetitions- und Supershift-Experimente für die <i>UGT1A10</i> -XRE-136-Bindestelle im EMSA	73
Abb.26: <i>UGT1A</i> -Induktion durch koffeinhaltigen und entkoffeinierten Kaffee im Luciferase-Assay in KYSE70-Zellen	74
Abb.27: <i>UGT1A1</i> -Induktion durch Kaffee auf Protein-Level (mittels Western Blot) in Mikrosomen von HepG2-, CaCo2- und KYSE70-Zellen	75
Abb.28: Kaffee vermittelte Induktion von <i>UGT1A1</i> , <i>UGT1A7</i> und <i>UGT1A10</i> in HepG2- (A) und CaCo2-Zellen (B)	75
Abb.29: <i>UGT1A1</i> -WT- und <i>UGT1A1</i> *28-Induktion durch verschiedene Kaffeesorten, Kakao und Tee	77
Abb.30: <i>UGT1A7</i> -WT- und <i>UGT1A7</i> *12-Induktion durch verschiedene Kaffeesorten, Kakao und Tee	77
Abb.31: <i>UGT1A10</i> -WT-Induktion durch verschiedene Kaffeesorten, Kakao und Tee	78

Abb.32: Einfluss der Behandlung mit Methylxanthinen auf die <i>UGT1A1</i> -, <i>UGT1A7</i> - und <i>UGT1A10</i> -regulierte Luciferase-Aktivität	79
Abb.33: <i>UGT1A1</i> -, <i>UGT1A7</i> - und <i>UGT1A10</i> - Induktion durch verschiedene Konzentrationen von C+K	80
Abb.34: Potentielle XRE- und ARE-Bindungsstellen im <i>UGT1A1</i> -, <i>UGT1A7</i> - und <i>UGT1A10</i> -Promotor	81
Abb.35: Mutagenese von XRE- und ARE-Bindestellen im <i>UGT1A1</i> - Promotor und dessen Einfluss auf die Kaffee-Induktion	81
Abb.36: Mutagenese von XRE- und ARE-Bindestellen im <i>UGT1A7</i> - Promotor und dessen Einfluss auf die Kaffee-Induktion	82
Abb.37: Mutagenese von XRE- und ARE-Bindestellen im <i>UGT1A10</i> - Promotor und dessen Einfluss auf die Kaffee-Induktion	83
Abb.38: Einfluss eines siRNA vermittelten AhR/Nrf2-Knockdowns auf die Kaffee-Induzierbarkeit von <i>UGT1A1</i>	84
Abb.39: Einfluss eines siRNA vermittelten AhR/Nrf2-Knockdowns auf die Kaffee-Induzierbarkeit von <i>UGT1A7</i> und <i>UGT1A10</i>	84
Abb.40: Kaffee vermittelte UGT1A-mRNA-Induktion in HepG2-Zellen	85
Abb.41: Kaffee vermittelte UGT1A-mRNA-Induktion in CaCo2-Zellen	86
Abb.42: Kaffee vermittelte UGT1A-mRNA-Induktion in KYSE70-Zellen und Einfluss eines siRNA vermittelten AhR/Nrf2-Knockdowns auf die Kaffeeinduktion der UGT1A-mRNA	87
Abb.43: AhR/Nrf2-Aktivierung durch Kaffee in HepG2-, CaCo2- und KYSE70-Zellen	87
Abb.44: Kaffee vermittelte UGT1A-mRNA-Induktion in der Leber und im Jejunum von humanisierten transgenen <i>UGT1A-WT</i> -Mäusen	88
Abb.45: Kaffee vermittelte UGT1A-mRNA-Induktion im Kolon von humanisierten transgenen <i>UGT1A-WT</i> -Mäusen	89
Abb.46: Kaffee vermittelte UGT1A-mRNA-Induktion im Magen von humanisierten transgenen <i>UGT1A-WT</i> -Mäusen.	89
Abb.47: Beispielhafte UGT1A-Transkriptvarianten-spezifische PCR von je einem RNA-Pool weiblicher <i>tgUGT1A-WT</i> - und <i>tgUGT1A-SNP</i> - Mäuse in Leber, Magen, Jejunum, Kolon und Niere	91

-
- Abb.48: Expression der verschiedenen UGT1A-Transkriptvarianten in Leber, Magen, Jejunum, Kolon und Niere von *tgUGT1A-WT*- und *tgUGT1A-SNP*-Mäusen 92
- Abb.49: Negativ-Kontrolle: UGT1A-Transkriptvarianten-spezifische PCR von einem RNA-Pool weiblicher nicht-transgener C57BL/6J-Mäuse in Leber, Magen, Jejunum, Kolon und Niere 94

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: **Sandra Kalthoff**

Geburtsdatum: 11.10.1979

Geburtsort: Aurich

Familienstand: ledig

Adresse: Elmstr.14, 30625 Hannover

Telefon: 0511 / 8983953

E-Mail: sandrakalthoff@hotmail.com

SCHULBILDUNG

1986-1990 Grundschule Papenburg

1990-1999 Mariengymnasium Papenburg

HOCHSCHULSTUDIUM

10/2000 – 05/2006 Studium der Biologie an der Carl-von-Ossietzky-
Universität Oldenburg, Abschluss: Dipl. Biologin

06/2005 – 05/2006 Diplomarbeit in der AG Neurogenetik (Uni Oldenburg)
bei Junprof. Dr. Silke Rinkwitz: "Erstellung von GFP-
Reportergenkonstrukten für transiente Expressionsstudien
im Zebrafisch."

AKADÄMISCHE TÄTIGKEITEN

02/07-12/09 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Klinik für
Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der
Medizinischen Hochschule Hannover

VERÖFFENTLICHUNGEN

PAPER:

- Erichsen TJ, Aeahlen A, Ehmer U, Kalthoff S, Manns MP, Strassburg CP.
Regulation of the human bile acid *UDP-glucuronosyltransferase 1A3* by the farnesoid-X-receptor and bile acids.
J Hepatol. 2010 Apr;52(4):570-8. Epub 2010 Feb 4.
- Kalthoff S, Ehmer U, Freiberg N, Manns MP, Strassburg CP.
Interaction between oxidative stress sensor nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and xenobiotic activated aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of the human phase II detoxifying UDP-glucuronosyltransferase 1A10.
J Biol Chem. 2010 Feb 26;285(9):5993-6002. Epub 2010 Jan 6.
- Lankisch TO, Behrens G, Ehmer U, Möbius U, Rockstroh J, Wehmeier M, Kalthoff S, Freiberg N, Manns MP, Schmidt RE, Strassburg CP.
Gilbert's syndrome and hyperbilirubinemia in protease inhibitor therapy-an extended haplotype of genetic variants increases risk in indinavir treatment.
J Hepatol. 2009 May;50(5):1010-8. Epub 2009 Mar 5.
- Strassburg CP, Kalthoff S, Ehmer U.
Variability and function of family 1 uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransferases (UGT1A).
Crit Rev Clin Lab Sci. 2008;45(6):485-530. Review.
- Ehmer U, Lankisch TO, Erichsen TJ, Kalthoff S, Freiberg N, Wehmeier M, Manns MP, Strassburg CP.
Rapid allelic discrimination by TaqMan PCR for the detection of the Gilbert's syndrome marker UGT1A1*28.
J Mol Diagn. 2008 Nov;10(6):549-52. Epub 2008 Oct 2.
- Lankisch TO, Gillman TC, Erichsen TJ, Ehmer U, Kalthoff S, Freiberg N, Munzel PA, Manns MP, Strassburg CP.
Aryl hydrocarbon receptor-mediated regulation of the human estrogen and bile acid UDP-glucuronosyltransferase 1A3 gene.
Arch Toxicol. 2008 Sep;82(9):573-82. Epub 2008 Aug 2.
- Erichsen TJ, Ehmer U, Kalthoff S, Lankisch TO, Müller TM, Munzel PA, Manns MP, Strassburg CP.

Genetic variability of aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated regulation of the human UDP glucuronosyltransferase (UGT) 1A4 gene.

Toxicol Appl Pharmacol. 2008 Jul 15;230(2):252-60. Epub 2008 Mar 4.

POSTER:

- Kalthoff S, Ehmer U, Freiberg N, Manns MP, Strassburg CP.
Coffee and glucuronidation: how coffee influences the transcriptional regulation of UDP-glucuronosyltransferases.
AASLD 2009
- Kalthoff S, Ehmer U, Freiberg N, Manns MP, Strassburg CP.
Differential and tissue-specific regulation of human UDP-glucuronosyltransferases (UGT) 1A9 and UGT1A10 by nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and aryl hydrocarbon receptor (AhR).
AASLD 2009
- Kalthoff S, Ehmer U, Freiberg N, Manns MP, Strassburg CP.
Coordinate regulation of the human *UDP-glucuronosyltransferase 1A10* gene by aryl hydrocarbon receptor (AhR) and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)
EASL 2009
- Kalthoff S, Ehmer U, Freiberg N, Manns MP, Strassburg CP.
Differentielle gewebespezifische Regulation der homologen UDP-Glukuronosyltransferasen (UGT) 1A9 und UGT1A10 durch den Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (Nrf2) und den Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR).
DGVS 2009
- Kalthoff S, Ehmer U, Freiberg N, Manns MP, Strassburg CP.
Koordinierte Regulation der extrahepatischen UDP-Glukuronosyltransferase (UGT) 1A10 durch den Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) und den Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (Nrf2).
DGVS 2008