

Aus dem Lehrstuhl für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
Prof. Dr. Gerd Schmitz
der medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

**Die Induktion des FGF19-Promotors durch Lithocholsäure in
Darmzellen wird durch PXR vermittelt**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Wolfgang Franz-Josef Wistuba

2009

Aus dem Lehrstuhl für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
Prof. Dr. Gerd Schmitz
der medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

**Die Induktion des FGF19-Promotors durch Lithocholsäure in
Darmzellen wird durch PXR vermittelt**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Wolfgang Franz-Josef Wistuba

2009

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter: PD Dr. Thomas Langman
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Hengstenberg
Tag der mündlichen Prüfung: 16.09.2009

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Für Karin, meine
treibende Kraft

Inhaltsverzeichnis

I Einführung.....	10
1 Die Synthese von Gallensäuren aus Cholesterin	10
2 Merkmale und Funktion von Kernrezeptoren.....	11
2.1 DNA-Erkennung und -Bindung von Kernrezeptoren	12
2.2 Ligandenbindung von Kernrezeptoren	14
3 Die Rolle von FXR und PXR im Gallensäurestoffwechsel	14
3.1 Kurzcharakteristik FXR	15
3.2 Kurzcharakteristik PXR	15
3.3 Gallensäuresynthese: Inhibition von CYP7A1	16
3.4 Exkretion von Gallensäuren.....	18
3.5 Reabsorption von Gallensäuren.....	19
3.5.1 Absorptionsmechanismen für Gallensäuren im Darm	19
3.5.2 Resorption der portalen Gallensäuren an den Hepatozyten.....	20
3.6 Endgültige Elimination von Gallensäuren	20
4 Die Rolle von PXR und FXR im Darm	21
II Material und Methoden	24
5 Zellkultur.....	24
6 Stimulation und Ernten der Zellen	25
7 Qualitätsbestimmung der gewonnenen RNA.....	26
8 Quantitätsbestimmung der RNA	27
9 Reverse Transkription der RNA.....	28
10 Quantitative real-time RT-PCR (Taqman) Analyse.....	29
10.1 Grundlagen der Transkriptionsanalyse	29
10.2 Prinzipien der PCR	29
10.2.1 Komponenten der PCR	30
10.2.2 Ablauf einer PCR.....	31
10.3 Grundlagen der real-time PCR.....	32
10.3.1 Einsatz von fluoreszenzmarkierten Sonden	32
10.3.2 Das Konzept des threshold-cycle (Ct-Wert)	33

10.3.3 Relative Quantifizierung	34
10.3.4 Praktische Anwendung der real-time RT-PCR (Taqman) in der Studie	35
11 Promotoruntersuchungen mittels Deletionskonstrukten und Luciferase-Reporter-Assays	36
11.1 Grundlagen	36
11.2 Auswahl der Konstrukt-Sequenzen	37
11.3 Einfügen von Restriktionserkennungssequenzen	41
11.4 PCR und Gelelektrophorese	42
11.5 Restriktionsverdau und Ligation	43
11.6 Klonierung der Reporter-Plasmide über die Transformation von Bakterien.....	45
11.6.1 Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> mit dem Ligationsprodukt.....	45
11.6.2 Selektion der Bakterien mit Reporter-Plasmid durch das Miniprep-Verfahren.....	47
11.7 Sequenzierung der Reporterplasmide und Großkultur mittels Maxiprep-Verfahren	48
12 Transfektion und Stimulation der LS174T-Zellen	50
12.1 Transfektion der LS174T-Zellen mit den Deletionskonstrukt integrierten Reporterplasmiden	50
12.2 Single-Plasmid-Transfektion	51
12.3 Co-Transfektion mit pSG5-hPXR und pSG5-hRXR	52
13 Ernten der Zellen und Messung der Luciferase-Aktivität	52
14 Analyse der PXR Bindungsmotive	53
III Ergebnisse	54
15 In intestinalen LS174T-Zellen wird FGF19 durch PXR-Induktoren (Rifampicin und LCA) induziert.....	54
16 Ein PXR responsives Element von FGF19 liegt innerhalb des kleinsten Deletionskonstrukt von -301 bp upstream bis +244 bp downstream .	57

17 Das proximale PXR responsive Element von FGF19 wird durch PXR/RXR-Heterodimere stimuliert	59
18 Bei -72 bp und -170 bp upstream des 1. Introns von FGF19 liegen zwei PXR-Bindemotive	61
19 Das ER6-Element ist zwischen Mensch und Maus konserviert.....	63
IV Diskussion	64
20 LCA beeinflusst FGF19 und den enterohepatischen Gallensäurekreislauf durch einen direkten PXR-abhängigen Mechanismus	64
21 Xenobiotika als PXR-Agonisten wirken als Stellgrößen in der Gallensäurehomöostase	64
22 Auswirkungen von Inflammation auf PXR-Zielgene	66
23 Auswirkungen von PXR-Aktivatoren auf mögliche systemische Effekte von FGF19	67
V Zusammenfassung	69
VI Danksagung und Lebenslauf	70
VII Quellenverzeichnis	73

I Einführung

1 Die Synthese von Gallensäuren aus Cholesterin

Die Leber ist das zentrale Organ der Cholesterinhomöostase im Körper: Einerseits findet hier die wesentliche *de-novo*-Synthese von Cholesterin statt, andererseits geschieht fast ausschließlich in den Hepatozyten der Abbau von Cholesterin zu den primären Gallensäuren Cholsäure (CA) und Chenodesoxycholsäure (CDCA). Die Gallensäuresynthese kann grundsätzlich über zwei verschiedene Reaktionswege erfolgen: Über den klassischen (oder auch „neutralen“) und über den alternativen (auch „sauren“) Syntheseweg. Während der klassische Syntheseweg ausschließlich in Hepatozyten möglich ist, kann der alternative Weg auch in anderen Geweben stattfinden.¹

Der wichtigste Syntheseweg ist bei Lebergesunden der klassische Weg, der alternative Weg dürfte wohl bei Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion eine Rolle spielen.

Beim klassischen Weg ist der erste Schritt im Abbau von Cholesterin zu Gallensäuren die Oxidation von Cholesterin zu 7 α -Hydroxycholesterin, katalysiert durch das Enzym 7 α -Hydroxylase (CYP7A1). Dieser erste Schritt ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des klassischen Syntheseweges. Eine Kaskade weiterer enzymatischer Schritte führt schließlich zur Synthese äquimolarer Mengen CA und CDCA, welche vor ihrer Exkretion mit Taurin und Glycin zu den primären Gallensäurekonjugaten modifiziert werden.

Im Darm fungieren Gallensäuren als Detergenz, um fettlösliche Nahrungsbestandteile wie Fettsäuren oder fettlösliche Vitamine aufnehmen zu können. Ein Teil der Gallensäuren wird durch Darmbakterien dekonjugiert und in die sekundären Gallensäuren Deoxycholsäure (DCA) und Lithocholsäure (LCA) umgewandelt. Zusammen mit tertiären und freien Gallensäuren werden über 95% der Gallensäuremetabolite in terminalem Ileum und Colon im enterohepatischen Kreislauf via Pfortader in der Leber

rückresorbiert. Durch chemische Umwandlung werden die reabsorbierten Gallensäuren wasserlöslich und können so über die Niere ausgeschieden werden.

Da Gallensäuren einerseits essentiell für die Aufnahme von Fettsäuren und fettlöslichen Nahrungsbestandteilen sind, andererseits jedoch bei Akkumulation zu einer Schädigung der Leber und des ganzen Organismus führen, müssen Synthese, Exkretion, Reabsorption und Detoxifizierung einer sensiblen Regulation unterliegen. Dabei spielen Kernrezeptoren als Transkriptionsfaktoren eine Schlüsselrolle zwischen äußerem Stimulus (Ligand) und DNA.^{2,3}

2 Merkmale und Funktion von Kernrezeptoren

Kernrezeptoren gehören zu Transkriptionsfaktoren, sie besitzen einen gemeinsamen Aufbau aus vier Domänen, die für spezifische Funktionen verantwortlich sind (Abb. 1): Eine variable N-terminale A/B Domäne (Modulatordomäne), eine DNA-Bindungsdomäne (DBD, C), eine Scharnierregion (D) und eine C-terminale Ligandenbindungsdomäne (LBD, E).⁴

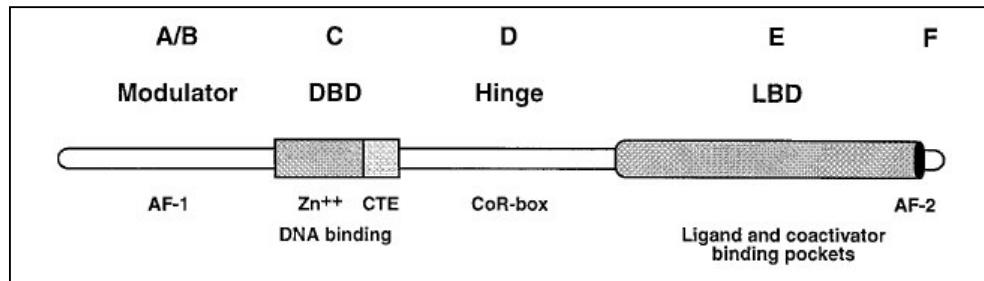


Abbildung 1: Typischer Aufbau eines Kernrezeptors

A/B: A/B-Domäne oder Modulator-Domäne mit activation function 1 (AF-1); C: C-Domäne oder DNA-Bindungsdomäne (DBD); D: D-Domäne oder Scharnier-Domäne, E: E-Domäne oder Ligandenbindungsdomäne (LBD), F: F-Domäne mit activation function 2 (AF-2) (aus [4]).

Wesentliches Merkmal von Kernrezeptoren ist ihre Fähigkeit zur Bindung kleiner, hydrophober Moleküle. Hormone, Vitamine oder Metabolite stellen regulatorische Signale dar, die die transkriptionelle Aktivität des Rezeptors

nach deren Bindung verändern. Lange wurde zwischen den klassischen Kernrezeptoren mit bekannten Liganden und den sogenannten Waisenrezeptoren (*orphan receptors*), für die zunächst noch kein eigentlicher Ligand isoliert wurde, unterschieden. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an Liganden für ehemalige Waisenrezeptoren identifiziert.^{4, 5}

Das Spektrum der Kernrezeptorliganden umfasst Vitamine wie Vitamin D3 (Vitamin D-Rezeptor, VDR), den Vitamin A-Abkömmling Retinsäure (Retinsäurerezeptor, RAR; Retinsäure-X-Rezeptor, RXR), Gallensäuren (Farnesoid-X-Rezeptor, FXR), Xenobiotika (Pregnan-X-Rezeptor, PXR), Fettsäuren, Eicosanoide (*Peroxisome Proliferation Activating Receptor*, PPAR), Oxysterole (*Liver-X-Receptor*, LXR) und Steroidhormone wie Östrogene, Progestine, Glucocorticoide, Mineralocorticoide, Androgene (Östrogenrezeptor, ER; Progesteronrezeptor, PR; Glucocorticoidrezeptor, GR; Mineralocorticoidrezeptor, MR; Androgenrezeptor, AR; *Constitutive Androstane Rezeptor*, CAR). Kernrezeptoren sind also an den verschiedensten Signaltransduktionswegen beteiligt.

2.1 DNA-Erkennung und -Bindung von Kernrezeptoren

Alle Kernrezeptoren erkennen Variationen desselben Hexamer-Grundmotivs 5'-RGKTC-3'. Durch die Variation einzelner Nukleotide, die Erweiterung des Motivs, dessen Duplikation und die relative Orientierung zweier Motive zueinander entsteht eine Vielzahl möglicher sogenannter *response elements* (REs).⁶ Die Nukleotidabfolge zwischen den Motiven wird als *spacer* bezeichnet (Abb. 2).

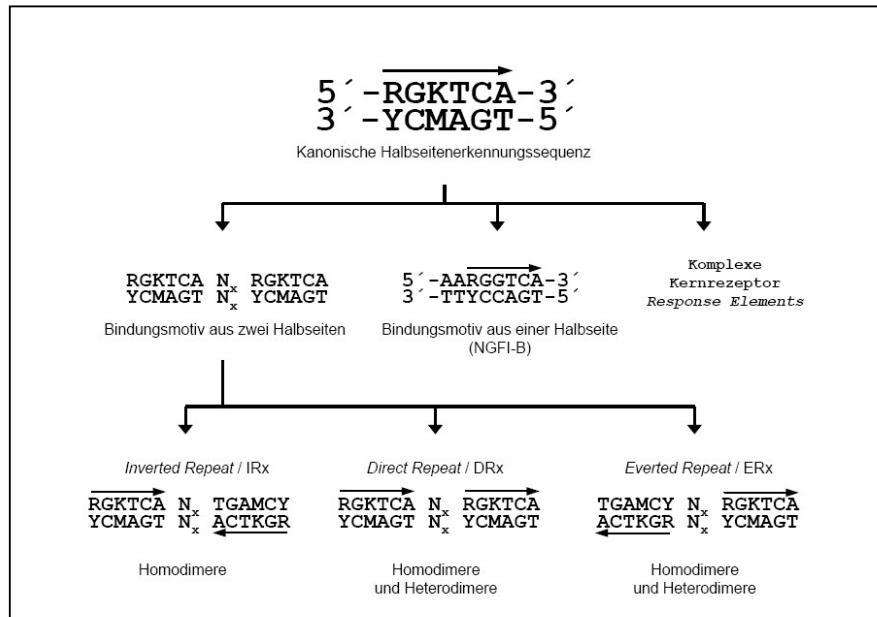


Abbildung 2: Kernrezeptor response elements (REs)

Die Erkennungssequenz ist 5'-RGKTCA-3'. Durch Duplikation des Halbseitenmotivs ergeben sich symmetrische *inverted repeats* (IRx), polare *direct repeats* (DRx) und symmetrische *everted repeats* (ERx) REs, wobei x die Anzahl der Nucleotidreste bezeichnet, durch die die beiden Halbseitenmotive voneinander separiert sind. Im Allgemeinen sind die Erkennungsmotive imperfect, d.h. die Sequenz einer oder beider Halbseitenmotive weicht von der rezeptorspezifisch idealen Erkennungssequenz in einem oder mehreren Nucleotidresten ab (aus [6]).

Die DNA-Bindungsdomäne (C-Domäne oder DBD) bindet spezifisch an das entsprechende *response element*. Sie enthält zwei Zinkfinger-Motive (Abb. 3), bei denen jeweils ein Zinkatom von zwei Cystein-Paaren koordiniert ist.⁷ Dadurch entsteht eine Struktur aus zwei α-Helices. Die am C-terminalen Ende der Helix gelegene P-Box ist dabei für die Diskriminierung zwischen verschiedenen REs von Bedeutung.

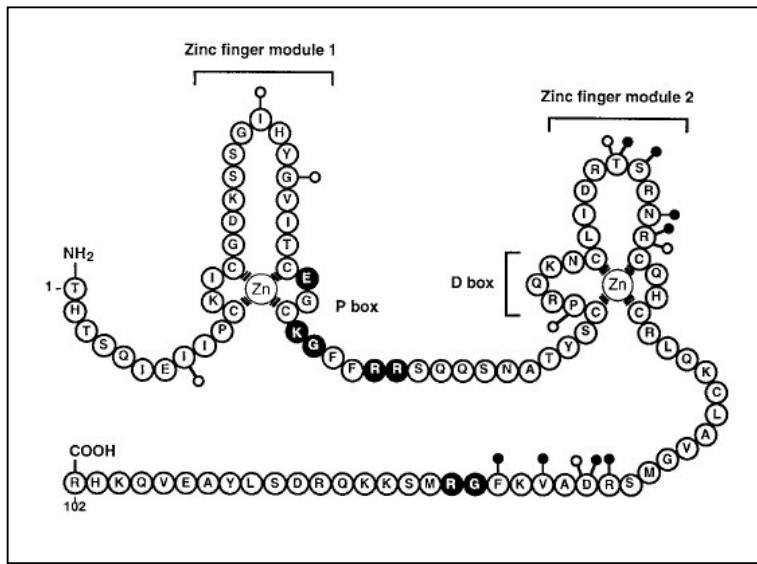


Abbildung 3: Schematische Darstellung der beiden Zinkfinger der DNA-Bindungsdomäne

Invariante Aminosäurereste sind im Einbuchstaben-Code dargestellt, variable Aminosäurereste als schwarze Punkte. P-Box und D-Box bezeichnen funktionelle Bereiche (aus [4]).

2.2 Ligandenbindung von Kernrezeptoren

Der Prozess der Ligandenbindung läuft folgendermaßen ab: Der Ligand bindet über elektrostatische Wechselwirkungen in die Ligandenbindungstasche. Dadurch wird eine Konformationsänderung des Rezeptors induziert, wobei wie bei einer Mausefalle das AF-2-Ende der LBD umklappt. Durch diese Konformationsänderung entsteht eine neue Rezeptoroberfläche, die das Binden von Koaktivatoren ermöglicht.⁴

3 Die Rolle von FXR und PXR im Gallensäurestoffwechsel

Der Gallensäurestoffwechsel umfasst vier Schritte: Synthese, Exkretion, Reabsorption und Detoxifizierung. Bei der Regulierung dieser Schritte spielen neben anderen Kernrezeptoren der Farnesoid-X-Rezeptor (*farnesoid x receptor*, FXR) und der Pregnane-X-Rezeptor (*pregnane x receptor*, PXR) eine entscheidende Rolle. Bevor die genauen Schlüsselstellen dieser beiden Kernrezeptoren näher erläutert werden, folgt zunächst eine Kurzcharakteristik von FXR und PXR.

3.1 Kurzcharakteristik FXR

Der Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) oder auch Gallensäurerezeptor wurde nach der Beobachtung benannt, dass mikromolare Mengen von Farnesol-Derivaten das Rattenortholog dieses Kernrezeptors aktivieren. Er bindet obligat als Heterodimer mit dem Retinsäure-X-Rezeptor (RXR) an DNA. Das typische *response element* des FXR/RXR-Heterodimeren-Komplexes ist ein *inverted repeat* des Hexanukleotids AG^G/TxTCA, welches durch ein einzelnes Nukleotid (x) getrennt ist, abgekürzt IR1. FXR wird in Geweben exprimiert, welche Gallensäuren ausgesetzt sind, also Leber, Darm, Gallenblase, Nieren und Nebennieren. FXR ist via negativer Feedback-Regulation hauptsächlich am Gallensäuremetabolismus beteiligt, wobei große Mengen an Gallensäuren die eigene Biosynthese hemmen.^{8, 9, 10}

3.2 Kurzcharakteristik PXR

Der menschliche Körper wird tagtäglich mit verschiedensten Stoffen konfrontiert, von denen manche toxisch wirken und bei Akkumulation ernsthafte Schäden verursachen würden. Während hydrophile Moleküle, z.B. Säuren relativ leicht über die Nieren ausgeschieden werden können, ist dies bei lipophilen Substanzen nicht ohne weiteres möglich. Schon lange ist bekannt, dass eine Reihe von lipophilen Stoffen aus der Umwelt (sog. Xenobiotika) oder vom Körper selbst produziert (sog. Endobiotika) die Synthese von Enzymen aus der Familie der Cytochrome P-450 (CYP450) induzieren, v.a. die Untergruppe CYP3A. Diese katalysieren oft den ersten Schritt im Umbau von lipophilen Edukten zu polaren Produkten. Dabei wurde beobachtet, dass diese Enzyme durch Substanzen unterschiedlicher Strukturen hochreguliert werden. 1998 wurde schließlich der Pregnan-X-Rezeptor (PXR) identifiziert, welcher mittlerweile als Schlüsselinduktor der CYP3A-Expression gilt. PXR wird in Leber und Darm exprimiert, beides Gewebe, in denen auch CYP3A-Vertreter ausgebildet und reguliert werden. Dabei bindet PXR als Heterodimer mit RXR an Xenobiotika responsive Elemente an CYP3A-Promotoren.¹¹

CYP3A-Enzyme katalysieren Redoxreaktionen in der sog. Phase 1 im Abbau von Xenobiotika. Hierbei spielen auch Carboanhydrasen und Carboxylesterasen eine Rolle. Über Phase-2-Reaktionen werden die Moleküle durch Konjugation mit polaren Resten weiter solubilisiert, wichtige Reaktionen sind hier Sulfatierung, Glucuronidierung, Acetylierung, Methylierung und Konjugation mit Glutathion. Schließlich werden in einer dritten Phase die neu entstandenen Produkte ausgeschleust, hierbei spielen Transportproteine eine entscheidende Rolle.¹²

Tab. 1 zeigt, welche Enzyme und Proteine aus Phase-1-, Phase-2- und Phase-3-Reaktionen durch PXR hochreguliert werden bzw. ein PXR responsives Element in ihrer Promotorregion enthalten und damit PXR reguliert sind. Diese Tabelle zeigt auch, dass PXR/RXR-Heterodimere im Gegensatz zu FXR/RXR an verschiedene *response elements* binden können.

Gene	Reference Sequence	Chromosome	Nuclear receptor binding motif			
Phase 1						
CYP3A4 ^a	NM_017460	7q21.1	-197	ata	TGAAC	caaagg AGGTCA gtg -173 ER6
CYP3A7 ^a	NM_000765	7q21.1	-174	ata	TTAAC	taatgg AGGTCA gtg -151 ER6
CYP209 ^a	NM_000771	10q24	-1817	aac	CAAAC	tcc TGACCT ctc -1795 DR4
CES2	NM_003869	16q22.1	-1536	gtt	TGACCT	tga TGGACA gac -1516 DR3
GPX1	NM_000581	3p21.3	-28	gcc	TGTGCC	acg TGACCC gcc -8 DR3
Phase 2						
GSTA1 ^a	NM_145740	6p12.1	-951	tct	TGGCCT	ttc TGGACT ttc -931 DR3
GSTM4 ^a	NM_000850	1p13.3	-614	tac	TGCAC	ttccggcc TGGGCA aca -591 ER6
GSTT1	NM_000853	22q11.23	-531	gca	GGGCCA	ggg AGACCA agg -511 DR3
SULT1A1	NM_001055	16p12.1	-837	tgc	TGCACA	gtt TGACCT gga -817 DR3
SULT1A3	NM_003186	16p11.2	-1319	gga	TGGCT	cgg TGCTCT agc -1299 DR3
SULT2A1 ^a	NM_003187	19q13.3	-142	ata	AGTC	tgt TGCTCA aca -121 DR4
UGT1A3	NM_019093	2q37	-203	gaa	ATTCCA	gcc AGTCAG ctg -183 DR3
Transporters						
ABCB1 ^a	NM_000927	7q21.1	-7855	cat	TGAAC	tact TGACCT tgc -7834 DR4
ABCC2	NM_000392	10q24	-103	tct	TGTACT	ttg GGAACT ggt -83 DR3
ABCC3	NM_003786	17q22	-584	aag	AGGACA	taag AGGCC CCG -63 DR4
Others						
FASN ^a	NM_004104	17q25	-672	cgt	TGACCG	gcgg TAACCC cgg -651 DR4
HMGCS1 ^a	NM_002130	5p14	-107	ctg	AGACCT	t TGGCCC ggt -89 DR1

Tabelle 1: DNA-Bindemotive in Promotorregionen von PXR-Zielgenen

^aDiese Gene enthalten veröffentlichte und experimentell nachgewiesene Bindestellen für Kernrezeptoren. Für alle anderen Gene wurde NUBIscan verwendet, um potentielle Bindestellen vorauszusagen. ER: everted repeat, DR: direct repeat (aus [31]).

3.3 Gallensäuresynthese: Inhibition von CYP7A1

Die Transkription des Schlüsselenzyms CYP7A1 zur Synthese der Gallensäuren im klassischen Weg kann durch eine Reihe von Substanzen

induziert bzw. gehemmt werden. Die Bedeutung von CYP7A1 wird anhand der Folgen einer CYP7A1-Genablation bei Mäusen deutlich: Signifikant erniedrigte Syntheserate von Gallensäuren, Unterernährung und erhöhte postnatale Sterblichkeit.¹³ Ferner konnte bei einer Familie mit vermehrtem Auftreten von Hypercholesterinämie, vorzeitigem Gallensteinleiden und vorzeitiger Atherosklerose eine Mutation im CYP7A1-Gen identifiziert werden.¹⁴

FXR wirkt bei Stimulation durch Gallensäuren, speziell durch CDCA, hemmend auf CYP7A1. Allerdings kann FXR nach Aktivierung nicht direkt am CYP7A1-Promotor binden. Die hemmende Wirkung von FXR geschieht indirekt über zwei verschiedene Mechanismen:

In der Leber wird bei Aktivierung von FXR der sog. *small heterodimer partner* (SHP) hochreguliert. Dieser atypische Kernrezeptor interagiert mit dem sog. *liver receptor homolog-1* (LRH-1), wodurch die Aktivierung von CYP7A1 (und CYP8B1, einem weiteren Enzym des Gallensäurestoffwechsels) inhibiert wird. Auf diese Weise hemmen Gallensäuren bei Akkumulation ihre eigene Synthese^{15, 16} (Abb. 4 und 5).

Für den Darm konnte jüngst nachgewiesen werden, dass bereits von dort aus über die Pfortader via FXR und *fibroblast growth factor 19* (FGF19) in den Gallensäurestoffwechsel eingegriffen werden kann. Auf diesen Mechanismus wird in Kapitel 4 näher eingegangen.

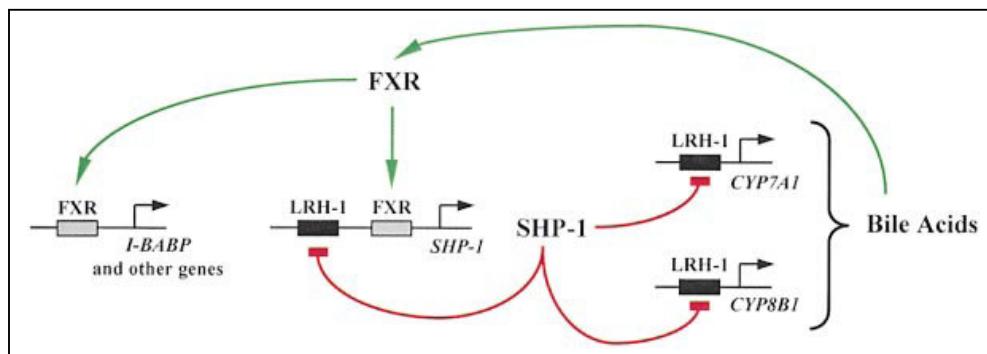


Abbildung 4: Modellhafte Darstellung der positiven und negativen Rückkopplungsmechanismen von Gallensäuren auf die Expression von Genen via FXR

Durch die Aktivierung von FXR über Gallensäuren wird die Expression von SHP-1 induziert. SHP-1 wiederum reprimiert die Expression von CYP7A1 und CYP8B1 und wahrscheinlich auch dessen eigene Expression (I-BABP: *ideal bile acid binding protein*, siehe Kapitel 3.5.1; aus [15]).

PXR spielt eine duale Rolle im Gallensäuremetabolismus: Zum einen werden via Aktivierung von PXR mehrere Gene gesteuert, welche für Umbau und Ausschleusung von Xenobiotika (Medikamente, z.B. Rifampicin) und Endobiotika (bestimmte Gallensäuren, z.B. LCA) verantwortlich sind (siehe Kapitel 3.2). Zum anderen übt PXR direkten Einfluss auf CYP7A1 aus: Neben der zweifach reduzierten basalen Expression fehlt bei PXR-Knockout-Mäusen die supprimierende Wirkung des PXR-Agonisten Pregnenolon-16 α -Carbonitril (PCN), welcher schon lange Zeit als Suppressor von CYP7A1 bekannt ist, völlig.¹⁷ Dabei lässt sich der supprimierende Effekt von PXR auf CYP7A1 nicht – wie bei FXR – über eine Hochregulation von SHP erklären.¹⁸ Wahrscheinlich spielt hier das *bile acid response element I* (BARE-I) eine Rolle, welches als potentielle Binderegion für Transkriptionsfaktoren im CYP7A1-Promotor identifiziert werden konnte.^{19, 20}

3.4 Exkretion von Gallensäuren

Nach der Konjugation der primären Gallensäuren CA und CDCA mit Taurin und Glycin entstehen die vier primären Gallensäurekonjugate Glykocholsäure, Taurocholsäure, Glykochenodesoxycholsäure und Taurochenodesoxycholsäure. Diese werden zum größten Teil über die ATP abhängige *bile salt export pump* (BSEP, auch ABCB11) in die Canaliculi des Gallenwegssystems ausgeschleust. Die Expression von BSEP wird bei vielen Spezies durch Änderungen im Gallensäurespiegel als positiver Rückkopplungsmechanismus geregelt, was bei Fütterungsversuchen mit Gallensäuren, nach biliärer Diversion oder bei Cholestase deutlich wird. Eine Schlüsselrolle nimmt hierbei FXR ein.²¹ Außerdem induziert neben FXR auch PXR das sog. *multidrug resistance associated protein 2* (MDR2, auch ABCC2), ein membranständiges Transportmolekül, welches sulfatierte, glukuronierte oder glutathionierte Moleküle aus den Hepatozyten in die Galle schleust und so neben Xenobiotika (z.B. Medikamente) auch Gallensäuren aus der Leber eliminiert werden können.²²

Die Gallenflüssigkeit wird zunächst in der Gallenblase gespeichert, bis als Reaktion auf Nahrungsaufnahme im proximalen Duodenum Cholezystokinin ausgeschüttet wird. Dadurch kontrahiert sich die Gallenblasenwand und die Gallenflüssigkeit gelangt ins Duodenum.

Als Gegenspieler dieses Mechanismus' fungiert möglicherweise *fibroblast growth factor* 15 (FGF15) bzw. FGF19²³ (siehe auch Kapitel 20).

3.5 Reabsorption von Gallensäuren

Der Rücktransport von Gallensäuren zur Leber beginnt mit der Absorption der Gallensäuren im Darm und endet via Pfortader und Lebersinusoide in den Hepatozyten, wodurch sich der enterohepatische Kreislauf schließt.

3.5.1 Absorptionsmechanismen für Gallensäuren im Darm

Nach Abgabe der Gallensäuren ins Canaliculi-System der Leber gelangen sie über die großen Gallengänge in den Darm. Hier stehen für die Reabsorption prinzipiell drei Wege zur Verfügung: Passive, nicht-ionische Diffusion sowie - Protein vermittelt - zum einen erleichterte Diffusion und zum anderen aktiver Transport.²⁴ Im oberen Intestinaltrakt findet nur eine geringe Reabsorption statt, hier stehen die Gallensäuren v.a. zur Erleichterung der Fettverdauung zur Verfügung. Erst im terminalen Ileum werden über einen apikalen Natrium abhängigen Gallensalz-Transporter (*apical sodium-dependent bile salt transporter*, IBAT) etwa 5% der enteralen Gallensäuren reabsorbiert.^{25, 26} Außerdem werden durch bakterielle 7α-Dehydroxylierung in Ileum und Colon Cholsäure in Desoxycholsäure und Chenodesoxycholsäure in Lithocholsäure umgewandelt. Diese sekundären Gallensäuren werden v.a. durch passiven Transport zu etwa 30-50% reabsorbiert. Durch weitere Abbauprozesse entstehen 7-Ketolithocholsäure und freie, also unkonjugierte Gallensäuren. Letztlich werden die reabsorbierten konjugierten und freien primären, sekundären und tertiären Gallensäuren an Albumin oder *high-density-lipoprotein* (HDL) gebunden via Pfortader zur Leber zurück transportiert.²⁵ Über diesen enterohepatischen

Kreislauf erreichen insgesamt 90-95% der abgegebenen Gallensäuren wieder ihren Ursprungsort Leber.

Speziell die Zellen des Ileums verfügen über die Möglichkeit, durch die Induktion von FXR (Abb. 4) das *ileum bile acid binding protein* (I-BABP) zu bilden, welches einerseits die Zellen des Ileums vor einer zu hohen intrazellulären Gallensäurekonzentration zu schützen vermag und andererseits als Transporter zwischen apikaler und basolateraler Membran fungiert.²⁴

3.5.2 Resorption der portalen Gallensäuren an den Hepatozyten

Über das Pfortaderblut gelangen die absorbierten Gallensäuren und deren Derivate in die Lebersinusoide. Hier werden konjugierte Gallensäuren über das Na^{2+} abhängige *taurocholat cotransport protein* (NTCP) in die Hepatozyten aufgenommen. Da Taurocholsäure in höherer Konzentration zelltoxisch wirkt, wird dadurch möglicherweise der Mechanismus erklärt, dass bei inflammatorisch bedingter Cholestase NTCP via FXR/SHP inhibiert wird.²⁷ Ein weiteres sinusoidales Transportprotein der Hepatozyten, OATP2 (*organic anionic transport protein 2*), transportiert Gallensäuren aus den Sinusoïden in die Leberzellen. Es wird einerseits durch FXR, andererseits durch PXR induziert.¹⁸ Hier besteht wiederum eine Verbindung zwischen dem Xenobiotika- und Gallensäurestoffwechsel.

3.6 Endgültige Elimination von Gallensäuren

Wie bereits ausgeführt unterliegt der Gallensäurepool im enterohepatischen Kreislauf einer ständigen Exkretion und Reabsorption. Nur ein kleiner Teil der Gallensäuren verlässt – unter physiologischen Bedingungen – den Körper via Faeces und Urin. Quantitative Messungen haben gezeigt, dass die Menge der zirkulierenden Gallensäuren etwa 5 bis 10 mmol beträgt. Bei einer täglichen Syntheserate von ca. 1 mmol beträgt die Gallensäureexkretion in den Darm 30 bis 60 mmol/d, sodass der Gallensäurepool täglich etwa sechs- bis zehnmal, also ca. dreimal während jeder Mahlzeit rezirkuliert. Der fäkale

Gallensäureverlust (1 mmol/d) entspricht der täglichen Syntheserate. Die Gallensäureausscheidung im Urin liegt bei Gesunden unter 8 µmol/d.²⁵

Für die Ausscheidung von Gallensäurederivaten, insbesondere in glukuronidierter Form, existiert am sinusoidalen Pol der Hepatozyten ein ATP abhängiges Transportprotein aus der Gruppe der *multidrug resistant proteins*, nämlich MRP3 (oder auch ABCC3). Es konnte gezeigt werden, dass darüber nicht nur glukuronidierte Gallensäurederivate ausgeschieden werden können, sondern auch glukuronidierte Derivate aus dem Xenobiotikastoffwechsel, wie z.B. Acetaminophen-Glukuronidat.²⁸ Wieder zeigt sich hier die enge Verzahnung zwischen Gallensäure- und Xenobiotikametabolismus. Es überrascht daher nicht, dass PCN, ein starker Induktor von PXR, ABCC3 in Mäuselebern hochreguliert.²⁹

4 Die Rolle von PXR und FXR im Darm

Während die Mechanismen der Gallensäurehomöostase und deren Regulation durch PXR und FXR in der Leber mittlerweile gut charakterisiert sind, werden deren Funktionsweise und Zielgene im Darm noch wenig verstanden. Allerdings zeigt sich in der aktuellen Literatur, dass diese beiden Kernrezeptoren und ihre Gallensäureliganden im Darm eine wichtige Rolle spielen.

So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass zur Aufrechterhaltung einer wirksamen antibakteriellen Blockade im Dünndarm die Anwesenheit von FXR erforderlich ist.³⁰ Außerdem konnte durch Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe³¹ und unabhängiger Befunde^{32, 33} gezeigt werden, dass eine fehlende oder insuffiziente Expression von PXR im Darm mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung (CED) bei Nagern und Menschen assoziiert ist. Demzufolge sind PXR-Zielgene im Darm möglicherweise als Marker geeignet, eine erhöhte Empfänglichkeit für eine CED nachzuweisen.^{34, 35}

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass FGF15 – das murine Ortholog von FGF19 – in der Leber³⁶ und in Darmzellen durch FXR hochreguliert wird.^{37, 38} Dieser Mechanismus war für unsere Arbeitshypothese von entscheidender

Bedeutung: Basolateral sezerniertes FGF15 gelangt via enterohepatischem Kreislauf zur Leber und dockt dort am *fibroblast growth factor receptor 4* an. Via *c-jun n-terminal kinase* (JNK) wird schließlich die Expression von CYP7A1 unterdrückt. Auf diese Weise fungiert FGF15 als enterohepatisches Signal: Noch bevor eine erhöhte Menge an Gallensäuren über Darm und Pfortader zur Leber gelangen, wird dort bereits die Gallensäuresynthese gehemmt (Abb. 5). Über diesen Mechanismus wird wahrscheinlich auch das Erschlaffen und somit Wiederauffüllen der Gallenblase gesteuert²³ (siehe auch Kapitel 20).

Das bisher Gesagte macht deutlich, dass die beiden Kernrezeptoren FXR und PXR in ihrer Funktion eng miteinander verzahnt sind und folglich Gallensäure- und Xenobiotikastoffwechsel nicht getrennt voneinander betrachtet werden können. Gerade die Tatsache, dass FGF19 via FXR im Darm hochreguliert wird, warf in diesem Zusammenhang folgende Frage auf: Inwieweit spielen PXR und dessen Agonisten ebenfalls eine Rolle in diesem Mechanismus?

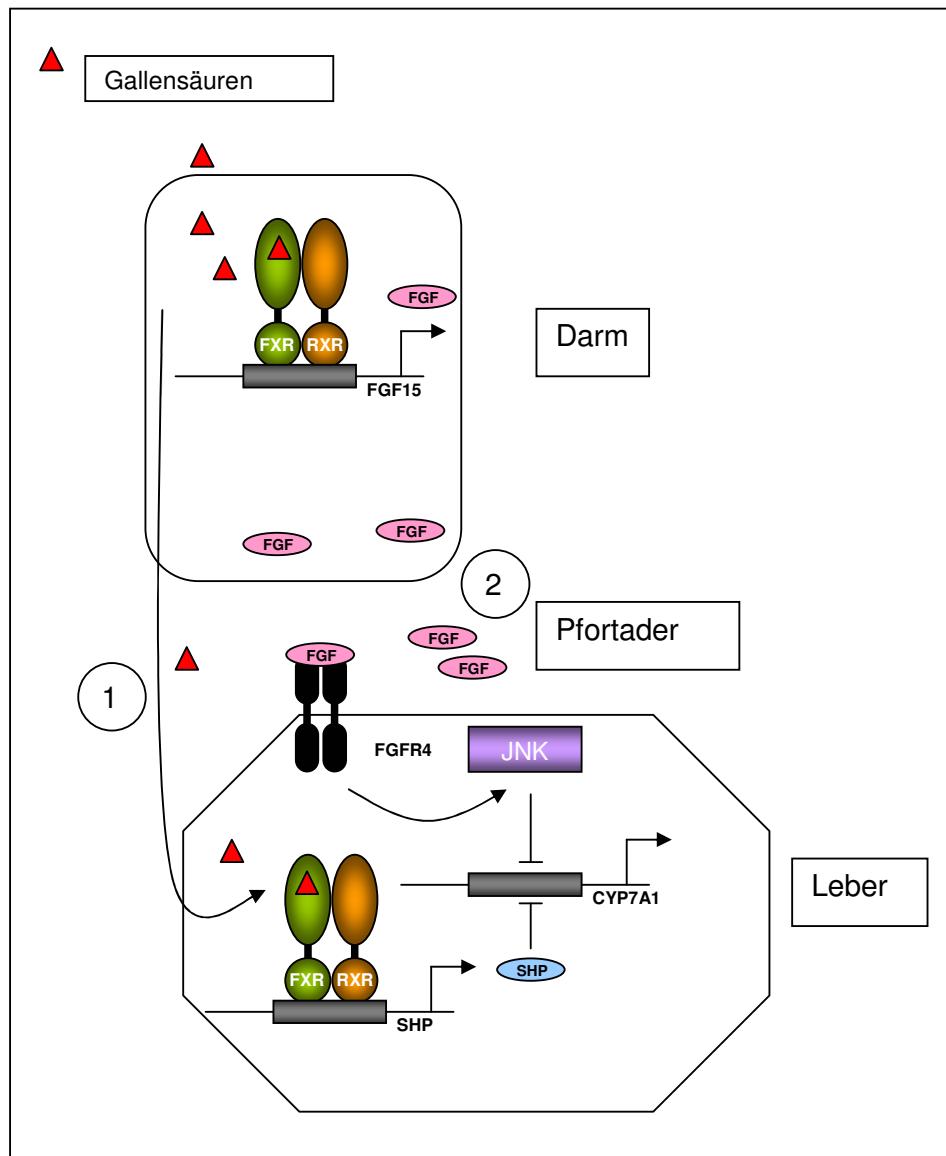


Abbildung 5: Modell zur Funktion von FXR als Repressor der Gallensäuresynthese (1) direkt im Hepatozyten über SHP oder (2) indirekt via Enterozyt und Pfortader über FGF19 Erläuterungen im Kapitel 4 (modifiziert nach [38]).

II Material und Methoden

5 Zellkultur

Für die Stimulationsversuche mit Gallensäuren wurde die Zell-Linie LS174T (ATCC, Manassas, USA) verwendet. Diese stammen aus dem Kolon und leiten sich von Tumorzellen aus dem kolorektalen Karzinom ab. LS174T-Zellen zeigten bereits in früheren Studien eine hohe basale Expression von PXR unter der Stimulation mit dem starken PXR Aktivator Rifampicin und erschienen deshalb als ideal für PXR-Stimulationsversuche. Die Zellen wurden in Dulbecco's modified eagle medium (D-MEM) unter Zugabe von 10% Hitze inaktiviertem fetalem Kälberserum, 2 mmol/l Glutamin und 1% (w/v) Penicillin/Streptomycin (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) unter 37°C und 5% CO₂ feuchter Atmosphäre kultiviert.

Inhaltsstoffe D-MEM:	g/mol	mg/l	mmol/l
<i>Aminosäuren</i>			
Glycin	75	30	0,400
L-Arginin Hydrochlorid	211	84	0,398
L-Cystin 2HCl	313	63	0,201
L-Glutamin	146	584	4,00
L-Histidin Hydrochlorid-H ₂ O	210	42	0,200
L-Isoleucin	131	105	0,802
L-Leucin	131	105	0,802
L-Lysin Hydrochlorid	183	146	0,798
L-Methionin	149	30	0,201
L-Phenylalanin	165	66	0,400
L-Serin	105	42	0,400
L-Threonin	119	95	0,798
L-Tryptophan	204	16	0,0784
L-Tyrosin Dinatrium Salz	261	104	0,398
L-Valin	117	94	0,803

Inhaltsstoffe D-MEM:	g/mol	mg/l	mmol/l
<i>Vitamine</i>			
Cholinchlorid	140	4	0,0286
D-Calcium Pantothenat	477	4	0,00839
Folsäure	441	4	0,00907
i-Inositol	180	7,2	0,0400
Niacinamid	122	4	0,0328
Pyridoxin Hydrochlorid	204	4	0,0196
Riboflavin	376	0,4	0,00106
Thiamin Hydrochlorid	337	4	0,0119
<i>Anorganische Salze</i>			
CaCl ₂ (anhyd.)	111	200	1,80
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	404	0,1	0,000248
MgSO ₄ (anhyd.)	120	97,67	0,814
KCl	75	400	5,33
NaHCO ₃	84	3700	44,05
NaCl	58	6400	110,34
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	138	125	0,906
<i>Weitere Komponenten</i>			
Phenolrot	376,4	15	0,0399

Das Medium der in Kultur gehaltenen, adhärent wachsenden Zellen wurde zwei- bis dreimal pro Woche gewechselt. Einmal pro Woche wurden die Zellen – je nach Wachstum – im Verhältnis 1:2 bis 1:4 subkultiviert.

6 Stimulation und Ernten der Zellen

Nach ein bis zwei Tagen Subkultur im Kulturmedium wiesen die Zellen eine hohe Dichte in ihrem Wachstum auf. Nach mikroskopischer Kontrolle des Zellwachstums wurden die Zellen mit 50, 100 oder 250 µmol/l CDCA- (Sigma, St. Louis, USA) oder LCA-Natriumsalz (aus undissoziierter, schwerlöslicher Säure (Sigma, St. Louis, USA) und äquimolarer Zugabe von

Natronlauge und Lösen unter Zugabe von Ethanol) oder mit 10 µmol/l Rifampicin (Eremfat®, Fatol Arzneimittel GmbH, Schiffweiler, Deutschland) als Positivkontrolle jeweils drei, sechs und 24 Stunden unter unveränderten Kulturbedingungen (s.o.) stimuliert.

Nach entsprechender Stimulationszeit wurden die Zellen nach Waschen mit PBS-Puffer (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) unter Verwendung des Qiagen RNeasy® Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) lysiert und die RNA isoliert: Hierbei werden die Proben in guanidinethiocyanathaltigem Puffer aufgeschlossen und homogenisiert. Anschließend wird Ethanol zum Lysat gegeben, um Bedingungen einzustellen, die eine selektive Bindung der RNA an die RNeasy® Silicagel-Membran begünstigen. Schließlich wird die Probe auf die RNeasy® Mini-Säule aufgetragen. Die Gesamt-RNA bindet an die Membran, Kontaminationen werden effizient ausgewaschen und qualitativ hochwertige RNA wird mit RNase-freiem Wasser eluiert. Alle Bindungs-, Wasch- und Elutionsschritte wurden bei Verwendung des Spin-Protokolls durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge ausgeführt.³⁹

7 Qualitätsbestimmung der gewonnenen RNA

Da die Qualität (Integrität) der RNA für alle folgenden molekularbiologischen Untersuchungen sehr wichtig war, musste auf eventuelle Degradationen geprüft werden. In dieser Studie konnte die Qualität der gewonnenen RNA mit Hilfe des Agilent Bioanalyzer 2100 bestimmt werden. Dieses System hat den Vorteil, dass nur sehr geringe Mengen (im Mikroliter Bereich) aller Substanzen benötigt werden, eine qualitative (und quantitative) Auswertung (in Form eines Elektropherogrammes) gemacht wird und dass die gesamte Analyse mit Vorbereitung in weniger als einer Stunde Ergebnisse liefert.

Prinzipiell wird eine Kapillarelektrophorese in einem kompakten Chipsystem durchgeführt. Durch Färbung der RNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff und Vergleich mit einem internen Standard können Größe der in der Probe vorhandenen rRNAs (18S und 28S) und ihr Verhältnis zueinander bestimmt werden. Alle Messschritte können am Computer verfolgt und das Ergebnis

schließlich ausgedruckt und archiviert werden. Reagenzien, Chip und Beschickungssystem sowie Hinweise zur Verarbeitung wurden vom Hersteller bezogen und entsprechend verwendet (Agilent Technologie, Santa Clara, USA).

8 Quantitätsbestimmung der RNA

Zusätzlich zur beschriebenen Integritätsmessung der RNA wurde die Konzentration photometrisch gemessen. Zwar wird im Rahmen der Qualitätsbestimmung der RNA mit Hilfe des Agilent Bioanalyzer 2100 auch eine Quantifizierung durchgeführt. Da aber bei den nachfolgenden Methoden die eingesetzten RNA-Mengen sehr genau sein mussten, wurde dieser Messschritt zusätzlich eingebaut. Dabei konnten Messfehler von 10 bis 20% zwischen Agilent- und Spektralquantifizierung nachgewiesen werden, wodurch die Notwendigkeit dieses Schrittes deutlich wird.

Nukleinsäuren (DNA und RNA) absorbieren elektromagnetische Wellen im UV-Bereich. RNA, DNA und freie Nukleotide haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, während die aromatischen Reste der Aminosäuren (z.B. Phenylalanin) bei 280 nm maximal absorbieren. Die Quotienten der Werte von 260 nm und 280 nm sind ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren (DNA: 1,8-2,0; RNA: 2,0-2,2). Eine reine, doppelsträngige DNA-Lösung hat mit OD₂₆₀=1 eine Konzentration von 50 µg/ml, eine einzelsträngige RNA-Lösung 40 µg/ml und eine Oligonukleotid-Lösung 33 µg/ml.

Die eingesetzten Stamm-RNA-Lösungen wurden zunächst bis 1:20 mit Wasser verdünnt und anschließend im Photometer die Konzentration bestimmt.

Nach Bestimmung von Qualität und Quantität der RNA-Stammlösungen wurden diese bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

9 Reverse Transkription der RNA

Die gewonnene RNA repräsentiert alle zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhandene RNA in der lysierten Zelle. Diese Summe wird als Transkriptom bezeichnet und enthält neben mRNA auch tRNA und rRNA.

Um in der folgenden real-time quantitativen PCR (siehe Kapitel 10) die Änderungen im Transkriptom und damit die Reaktion der Zelle auf einen Stimulus nachweisen zu können, muss die gewonnene RNA zunächst in komplementäre DNA, cDNA, umgeschrieben werden. Dieser Vorgang wird als reverse Transkription bezeichnet.

Material:

(Promega GmbH, Mannheim, Deutschland; doppelter Ansatz)

MgCl ₂ , 25mM	8,0 µl
Reverse Transcription 10X Buffer	4,0 µl
dNTP Mixture, 10mM	4,0 µl
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	1,0 µl
Random Primers (0,5µg/µl)	1,0 µl
AMV Reverse Transcriptase (High Conc.)	30 U, 1,2 µl
RNA	2 µg
nucleasefreies Wasser	ad 40 µl

Schema:

- Vorlegen der o. g. Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge.
- Zur Steigerung der Ausbeute laut Protokoll Inkubieren des Reaktionsansatzes 60 min bei 42 °C.
- Um die Aktivität der AMV reversen Transkriptase und deren Bindung an die gewonnene cDNA zu hemmen wurde der Ansatz für 5 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend erfolgte ein fünfminütiges Abkühlen auf Eis.

- Zuletzt wurde der Ansatz im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.⁴⁰

10 Quantitative real-time RT-PCR (Taqman) Analyse

10.1 Grundlagen der Transkriptionsanalyse

Zellen haben im Laufe der Evolution „gelernt“, auf Veränderungen der Umwelt, auf Signale untereinander und schließlich auf übergeordnete Zentren zu reagieren, um sich selbst oder dem zugehörigen Organismus Anpassung und somit Überleben zu sichern. Die Signalwege, welche letztlich in der Zelle – ausgehend von einem Stimulus – eine Reaktion hervorrufen, sind äußerst vielfältig. Kernrezeptoren nehmen dabei nur einen Teil der Signaltransduktion ein. Die letztlich hervorgerufene Reaktion ist allerdings universal: Induktion oder Hemmung der Transkription von bestimmten Genabschnitten, wodurch im Rahmen der Translation Proteine synthetisiert werden, die es der Zelle erlauben, adäquat auf den Stimulus zu reagieren. Der negative Feedbackmechanismus, bei erhöhter intrazellulärer Gallensäurekonzentration die Expression für CYP7A1 zu hemmen, ist nur ein Beispiel für ein solches Reaktionsmuster.

Um die Reaktion der Zelle auf Stimuli nachzuweisen, können auf verschiedenen Ebenen der Signal-Reaktions-Kaskade die Reaktionspartner oder -produkte bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde auf die quantitative real-time Analyse einer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (real-time RT-PCR-Analyse) zurückgegriffen, bei der durch relative Quantifizierung der mRNA-Kopien vor und nach Stimulierung der Zellen gezeigt werden kann, ob und wie intensiv eine Zelle auf Transkriptionsebene auf einen Stimulus reagiert.

10.2 Prinzipien der PCR

Die Grundzüge der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurden als erstes von Kary Mullis beschrieben, welcher bereits 1993 –

nur sieben Jahre nach Veröffentlichung – dafür den Nobelpreis bekam. Seitdem ist die PCR zu einer der häufigst benutzten molekularbiologischen Methoden geworden. Die Grundzüge der PCR sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

10.2.1 Komponenten der PCR

Eine Standard-PCR benötigt folgende Komponenten:

DNA Templat

Sie dient als Vorlage und muss die Sequenz enthalten, welche amplifiziert werden soll.

Primer

Zwei Primer, *forward* und *reverse primer* (*f-primer* und *r-primer*) oder *sense*- und *antisense-primer*, binden spezifisch an Start- und Endstelle der zu amplifizierenden Sequenz und markieren sie so für die DNA-Polymerase. Sie werden während der PCR verbraucht.

DNA-Polymerase

Dieses Enzym amplifiziert die gewünschte Sequenz auf der Templat-DNA ausgehend von den gebundenen Primern. Dabei ist von Bedeutung, dass die verwendete Polymerase ausreichend hitzestabil ist, um Temperaturen um 95 °C zu überstehen. Eine der ersten eingesetzten Polymerasen wurde aus *Thermophilus aquaticus* entnommen (Taq-Polymerase), weitere Vertreter sind Pwo- oder Pfu-Polymerase.

Nucleotide

Sie dienen der DNA-Polymerase als Ausgangssubstrat in der Phase der Elongation und werden während der PCR verbraucht.

Puffersubstanzen

Sie halten das Milieu stabil, welches die DNA-Polymerase für optimale Reaktionsbedingungen benötigt.

10.2.2 Ablauf einer PCR

Die PCR läuft in Zyklen ab, ein Zyklus besteht immer aus den gleichen drei Schritten:

Denaturierung

Die zunächst als Doppelstrang vorliegende DNA wird durch Erhitzen auf 94 bis 96 °C in ihre Einzelstränge aufgeteilt. Durch das Erhitzen werden die Wasserstoffbrücken zwischen den Einzelsträngen aufgelöst und so erst die weiteren Reaktionsbedingungen geschaffen.

Annealing

Durch Abkühlen der Reaktionsbedingungen können die zugefügten Primer, die spezifisch als Startstellen für die Polymerase dienen, an die einzelsträngige DNA binden. Durch die richtige Wahl der Primer wird dabei gewährleistet, dass nur die gewünschte Sequenz auf dem Templat markiert wird und keine falschen Sequenzen amplifiziert werden. Dieser Schritt läuft, je nach optimalen Schmelzpunkten der Primer, bei 45 bis 60 °C ab.

Elongation

In diesem dritten und letzten Schritt verlängert die DNA-Polymerase die gebundenen Primer. Für die Taq-Polymerase ist eine Temperatur von 72 °C optimal. Je länger die zu amplifizierende Gen-Sequenz ist, desto länger braucht die DNA-Polymerase Zeit dafür. Als Faustregel kann gelten, dass für ein 1 kB großes Produkt ca. eine Minute Elongationszeit benötigt wird.

Nach dem letzten Schritt beginnt der nächste Zyklus wieder mit der Denaturierung, entsprechend terminiert dieser Schritt die Elongation.

Nach jedem Zyklus verdoppelt sich das Amplikon, entsprechend liegen theoretisch nach n Zyklen 2^n Kopien vor. Praktisch geht die exponentielle Phase der Reaktion schließlich in ein Plateau über, da Primer und Nukleotide allmählich verbraucht werden.

10.3 Grundlagen der real-time PCR

Die real-time PCR nutzt zunächst die Ziele der herkömmlichen PCR: Wenige Kopien einer DNA-Sequenz reichen zu Beginn der Zyklen aus, um nach und nach verwertbare Mengen an DNA-Amplikons zu erhalten. Ein entscheidender Schritt kommt aber noch hinzu: Bei der real-time PCR werden die Reaktionsabläufe kontinuierlich von Zyklus zu Zyklus beobachtet. Je mehr DNA einer spezifischen Sequenz zu Beginn der Reaktion vorgelegen hat, desto früher lässt sie sich in der Abfolge der Reaktionszyklen nachweisen. Betrachtet man eine Mischung aus verschiedenen DNA-Sequenzen unbekannter quantitativer Zusammensetzung, die insgesamt nur wenige Moleküle an DNA enthält, kann mithilfe der real-time PCR einfach gemessen werden, welches Verhältnis die DNA-Moleküle ursprünglich zueinander eingenommen haben. Theoretisch würde der Inhalt einer Zelle ausreichen, um durch die real-time Quantifizierung festzustellen, welche DNA-Sequenzen mengenmäßig am meisten vorgelegen haben.

Dabei werden zwei Grundvoraussetzungen für dieses Messprinzip deutlich: Zum einen kann mRNA nicht direkt als Reaktionspartner dienen, da die eingesetzte Taq-DNA-Polymerase nur DNA binden kann. Der Vorgang der reversen Transkription wurde unter Kapitel 9 bereits erläutert.

Zum anderen müssen die ursprünglichen PCR-Reaktionspartner, bestehend aus DNA-Polymerase, Primern, Nukleotiden, DNA und Puffern um Reagenzien erweitert werden, welche es erlauben, nach jedem Zyklus den "status-quo" der Reaktion einfach und sicher zu messen. Im Folgenden soll dieser zentrale Unterschied zur herkömmlichen PCR kurz erläutert werden.

10.3.1 Einsatz von fluoreszenzmarkierten Sonden

Allen derzeit üblichen real-time PCR-Methoden gemeinsam ist der Einsatz von fluoreszierenden Farbstoffen, wodurch die beiden PCR-Schritte Amplifizierung und Elongation genutzt werden können, um die PCR-Reaktionszyklen in Echtzeit beobachten zu können. Die einfachste Art und Weise besteht darin, einen Farbstoff zu benutzen, der an Doppelstrang-DNA

bindet. Die anderen drei Formen – *molecular beacon assay*, *lightcycler assay* und *taqman assay* – basieren auf der Hybridisierung Fluoreszenz markierter Sonden mit dem spezifischen Amplikon.

Der hier benutzte *taqman assay* setzt den Einsatz dreier spezifischer Oligonukleotide voraus: Zwei Oligonukleotide binden als *forward-* und *reverse-primer* spezifisch an die Endpunkte des Templates. Ein drittes Oligonukleotid bindet während der Phasen *annealing* bzw. *extension* spezifisch an das Templat. Diese Sonde trägt an ihrem 5'-Ende einen fluoreszierenden Farbstoff (*reporter*), dessen Emissionsspektrum durch einen weiteren Farbstoff am 3'-Ende (*quencher*) geblockt wird. Solange kein DNA-Amplikon vorliegt, an das diese Sonde binden kann, bleibt sie intakt. Liegt allerdings das zugehörige Amplikon vor, kann die Sonde nach dem Denaturierungsschritt daran binden. Während die Taq-Polymerase die Primer bei der Extension verlängert, stößt sie irgendwann auf die bis dahin gebundene Sonde. Da das Enzym eine Doppelstrang spezifische 5'-Exonuklease-Aktivität besitzt, trennt sie die Bindung zwischen Sonde und Amplikon wie eine Gabel auf, um die Extension fortzusetzen. Dabei werden die beiden Farbstoffe an den Sondenenden getrennt. Dies setzt die Emission des bis dato geblockten Farbstoffes am 5'-Ende der Sonde frei, die nun detektiert werden kann.⁴¹

10.3.2 Das Konzept des threshold-cycle (Ct-Wert)

In der real-time PCR wird heute nicht mehr primär in DNA Produktmengen oder -konzentrationen gerechnet, sondern als Maß für die Quantifizierung der Startmenge wird der sog. *threshold-cycle* herangezogen. Die Fluoreszenz-Niveaus werden nach jedem Zyklus gemessen und repräsentieren die Menge an amplifiziertem Produkt bis zu diesem Zeitpunkt. Je mehr Ausgangstemplat zu Beginn der rt-PCR vorgelegen hat, desto eher wird ein Fluoreszenz-Niveau erreicht, welches signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegt. Dieses „Schwellen“-Fluoreszenzniveau liegt

definitionsgemäß in der exponentiellen Phase der Amplifizierung und wird Ct-Wert – *threshold-cycle* – genannt.⁴¹

10.3.3 Relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes „*housekeeping Gen*“ (HKG) oder auf einen HKG Index, der sich aus mehreren HKGs zusammensetzt, bezogen. Man nennt diesen Vorgang auch Normalisierung der Expressionsergebnisse. Dabei werden nicht die absoluten Startkopienzahlen oder -konzentrationen bestimmt, sondern die Expression des zu untersuchenden Gens wird auf ein zweites, ubiquitär und homogen exprimierte Gen bezogen. Der Vorteil der Normalisierung liegt in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der reversen Transkription innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das HKG betreffen. In den folgenden Berechnungen des Expressionsunterschiedes heben sich diese individuellen Probeneffekte wieder auf. GAPDH, ribosomale Untereinheiten (18S und 28S), Ubiquitin, Histon Untereinheiten und β-Aktin sind wohl die geläufigsten HKG, die zur Normalisierung herangezogen werden. Die relative Expression des zu untersuchenden Gens in den behandelten experimentellen Proben wird auf ein Kontrollprobenmaterial bezogen. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) kann über die sog. ΔΔCt Methode erfolgen. Dabei wird im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta Ct = Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ Referenzgen}$). Nach dieser Normierung wird vom ΔCt Wert der experimentell behandelten Proben der ΔCt Wert einer Kontrolle abgezogen (ΔCt); man kommt zum sog. „delta-delta Ct“ Berechnungsmodell. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$.⁴²

Zusammenfassend gilt:

$$\Delta Ct = Ct \text{ (Zielgen)} - Ct \text{ (Referenzgen)}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (Stimulation)} - \Delta Ct \text{ (Kontrolle)}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

10.3.4 Praktische Anwendung der real-time RT-PCR (Taqman) in der Studie

Im Rahmen dieser Arbeit kam der ABI7900HT (Applied Biosystems, Foster City, USA) zum Einsatz. Alle für die Taqman RT-PCR benötigten Chemikalien inkl. Sonden und Primern wurden von Applied Biosystems bezogen und wie folgt eingesetzt:

Taqman universal PCR master mix 10 µl
(beinhaltet AmpliTaq Gold DNA Polymerase,
dNTPs, passive Referenz und
optimierte Puffer-Komponenten)

20x Mix 1 µl
(beinhaltet spezifischen *forward primer*,
reverse primer und Farbstoff-Sonde)

H₂O 4 µl

cDNA 5 µl

Für die Taqman-Analyse der FGF19-Expression wurde ein vorentwickelter und optimierter (*pre-designed and optimized Assay on Demand*) von Applied Biosystems bezogen (Assay Hs00192780_m1). Als HKG diente eukaryote 18s rRNA (Assay Hs99999901_s1) Die Reaktionszyklen der RT-PCR waren wie folgt: Alle Messungen wurden als Triplikate ausgeführt. Die Reaktionsparameter waren: 2 min bei 50 °C hold, 30 min bei 60 °C hold; anschließend 35 Zyklen mit jeweils 20 s Denaturierung bei 94 °C und 1 min

Annealing/Extension bei 60 °C. Die Messergebnisse wurden mit der ABI SDS (*sequence detecting software*) version 2.0 ausgewertet und die relativen Expressionen mithilfe von Microsoft Excel tabellarisch verglichen und als Diagramme dargestellt.

11 Promotoruntersuchungen mittels Deletionskonstrukten und Luciferase-Reporter-Assays

11.1 Grundlagen

Um die Aktivität eines Gens regulieren zu können, bedarf es Mechanismen, welche es erlauben, dessen Expression bei Bedarf an- und wieder abstellen zu können. Neben anderen Regulationsmechanismen können Kernrezeptoren durch direkte Bindung an entsprechende Zielregionen der DNA letztlich die Transkription eines Gens durch die RNA-Polymerase und so die weitere Prozessierung bis hin zum Protein initiieren (siehe Einführung). Diese Startstellen werden als Promotoren bezeichnet und sitzen entsprechend der Leserichtung der RNA-Polymerase an 5'-Position „oberhalb“ des Start-Codons des Gens. Die Promotorelemente werden durch ihren Abstand vom Transkriptionsstartpunkt bezeichnet. Der Startpunkt hat die Bezeichnung +1, stromaufwärts (*upstream*) gelegene Bereiche haben negatives, stromabwärts (*downstream*) gelegene Bereiche entsprechend positives Vorzeichen.

Die bisher nachgewiesenen PXR-Bindestellen wurden im Kapitel 3.2 bereits beschrieben. Der Nachweis dieser Sequenzen in unmittelbarer Nähe einer Gen-Startstelle macht wahrscheinlich, dass PXR daran bindet, wobei die Vielfalt der beschriebenen Sequenzen von PXR-Promotorstellen keinen eindeutigen Schluss auf eine „universale“ Basenabfolge zulässt. Das bedeutet, dass die reine Sequenzanalyse des Genabschnittes mit möglicher PXR-Promotorregion keinen eindeutigen Nachweis derselben zulässt. Denn umgekehrt kann bei Fehlen einer bekannten PXR-Bindestelle nicht gefolgert werden, dass PXR nicht daran bindet. Werden jedoch Sequenzanalysen mit

den Ergebnissen aus in-vitro-Stimulationen durch bekannte PXR-Agonisten kombiniert, kann daraus mit hoher Wahrscheinlichkeit das Bindeverhalten abgeleitet werden.

Um nachzuweisen, dass ein bestimmtes Gen – in diesem Fall FGF19 – durch PXR reguliert wird, wurden in dieser Studie Deletionskonstrukte der DNA oberhalb des FGF19-Gens in verschiedenen Längen kloniert. Verschiedene Längen deshalb, weil die Lage des Promotors nicht vorausgesagt werden kann und zum anderen die Wahl von verschiedenen Konstrukt-Längen die anschließende Sequenzanalyse einschränkt.

Um die Promotoraktivität quantitativ nachzuweisen, wurden die Promotorkonstrukte mit dem 5'-Ende eines Reporter-Gens verknüpft, dessen Genprodukt – im Gegensatz zum ursprünglich regulierten Gen – leicht und sicher nachzuweisen ist. In dieser Studie kam Luciferase als Reporter-Protein zum Einsatz, welche unter Zugabe eines bestimmten Substrates eine detektierbare Lichtemission katalysiert.

11.2 Auswahl der Konstrukt-Sequenzen

Die Konstrukte mit möglichem PXR-Promotorelement mussten vor Klonierung zunächst definiert werden. Die exakte Basensequenz von FGF19 wurde von www.ensembl.org bezogen. Der Exon-1-Startpunkt von FGF19 liegt auf Chromosom 11 bei 69228287.

Gensequenz FGF19, Chromosom 11, 69.230.287 – 69.227.787

-2000	tgtgcctgtgagatggccggcacacagctgacctaaggcctgccatcaa
-1950	<u>cacccatcatgagtgctacatcccaggccctcttgtccctttccttgt</u>
-1900	caccctcaggacaaggctgagagaagctgagagggcaatgggtcagcgg
-1850	tccacgacctaccaggagtgccgggtgtatccatgctacagtgggt
-1800	ctgaccggaggccctgtccggataagacgcagcacagcctggatt
-1750	acgagccccactgttgggttcaaattccaacttcaccactaacagagt
-1700	tgcgaccttgggttactcgccactttctggggcattccctctgt
-1650	ccatggggaggaggaatagaatactgtggggctttgtggagattt

-1600 agctgagaacccatgaagcgctcagaacaggggctggggacagcagc
-1550 cgccttcctcattccccacccctcgatcgcatcagccactcttccc
-1500 catgtccctggaaggggctgcagagggtaggggtggaaccagaggctgc
-1450 catcgcccccccccccggttgggtcggtgtcccccagtgcagcctctgccat
-1400 cgccctcaagagcattatcacgcattaccacggatcttaaaacgaaa
-1350 gctgcaggggagggttaatttaataggagccgcgtcgatttaag
-1300 ccacagggggagaagtaatttagattaaacagaagccacggcttctgaacc
-1250 aagacacacagcgtgggggtccctggtctagaaagccttcggatgatgt
-1200 cttttgtaaagactttcctggtgcacattgcgcctcagtcattaa
-1150 cgccagtcactgactgggaatgaatgtggcctctgctcattgaaattca
-1100 ttaggcctggcatttcctcgctgtctctcctgtttgcctccatcgc
-1050 cttgcgtggccaggaggctctgccccaaaaccagccttcggc
-1000 cccacatccaggagctgggggttggaaagaataacaagaataattagag
-950 ttaaaccaaagccccgtaggaggacccttattccccgcctggatttc
-900 tctggatgtcgcccctattggcaggaaccgcttcatggagcggcccc
-850 catttcttcctcacctggcacctgcccggacgcccaggggcgccatcac
-800 cgttcctggccccccttcccgaccctccccaccaggtaaggcgcttcga
-750 cctccccgaccgtgctgttcctcctgaccggcgtgcgcaggactcgggga
-700 ctcaaaaaccagaccccgacacaagacagctaaaaacggaaacgga
-650 ggcccaggcctccctccctgcgcctgcctccaccaccctccagccgag
-600 aagctgggttaccaatccgcagctggccgcaccctgcccggag
-550 cctcctcccagtgcccctttaggtgcatctcggcacagccgcgg
-500 gccggggcgagcgccggaggcaggcaggggcgccaggagcgcaaagc
-450 ccaggcggacgcccggaggctgcggcgccacccatcagtcgcgcggcttcca
-400 ttgtttccccggccggcggagagcgccggccggccgtcgaaaaaaat
-350 ttacccggataaaaggggcgccccaggaattgcaagaagatgaagctgaaaa
-300 agaacacctgagactgtcggaactgcccggggaaaatttacgggacggctt
-250 gacgtcagatgtgcgggctgcgaaagtccccggggagggagtcgcgagtg
-200 cttaaggggaagggcactaaggccgagggtgaggctttccgacagag

-150 ggtgaaggggggcaaaactcggtccccccaaacctctggccccggggttcc
-100 tgaccccgcccccgctagtgcacccacgcccagtgcatccactgggagcct
-50 gaggcctgggggaagggccccagttgtcgattgcttacaaagtcaaact
+1 Ctcccagccaagaacctcggggccgctgcgcggtggggaggagttccccg
+51 aaaccggccgctaagcgaggcctcctcccgagatccgaacggcct
+101 gggcggggtcaccccgctggacaagaagccgcccgcctgcctgcccgg
+151 cccggggagggggctggggctggggccggaggcgggggtgtgagtgggtgt
+201 gtgcggggggcggaggcttgatgcataaggaaatgctcggtgt
+251 ctgggcacctaccgtggggccgtaaggcgctactatataaggctgcc
+301 ggcccgagccgcccgcgtcagagcaggagcgtgcgtccaggatcta
+351 gggccacgaccatccaaaccggcactcacagccccgcagcgcatcccg
+401 tcgcccggccagcctccgcaccccatgcggagctgcggagagccc
+451 caggaggtgcacatgcggagcgggtgtgtggtccacgtatggatcct

Die Konstrukte wurden so gewählt, dass die *forward primer* upstream die Bereiche -250 bp, -500 bp, -1000 bp und -2000 bp flankieren. Als *reverse primer* wurde der Bereich bis +250 bp downstream gewählt. Für jeden Bereich wurden zwei Primer definiert, um die Erfolgsrate bei der nachfolgenden PCR zu erhöhen. Beim Primer-Design wurden die zusammengestellten Regeln der University of Capetown, Department of molecular and cell biology (<http://www.mcb.uct.ac.za/pcroptim.htm>) berücksichtigt.

Mit folgenden Primern konnte in der nachfolgenden PCR ein Amplikon erzielt werden (siehe unterstrichene Bereiche in der Basensequenz):

f-primer:

- 1954: 5'-tcaaacacctcatgagtgcatacatc-3'
- 882: 5'-tattggcaggaaccgcgtcatggag-3'
- 532: 5'-cttcaggtgcacatctcgccacag-3'
- 301: 5'-aagaacctgagactgcggactgc-3'

r-primer:

+244: 5'-gagcatttttatcgggattgcac-3'

Als Positiv-Kontrolle wurde die proximale PXR-Promotorregion von CYP3A4 gewählt. CYP3A4 liegt auf Chromosom Nr. 7, Exon 1 bei bp 99219744. Die PXR-Bindestelle liegt als ER6 bei -169 bp upstream (siehe Rahmen).

Gensequenz CYP3A4, Chromosom7, 99.219.494 – 99.220.244

-500 tgcccaggggaggaaatggttacatctgtgtgaggagttggtaggaaa
-450 gactctaagagaaggcttgttgtctggggttggaggatgtgttaggag
-400 tcttctagggggcacaggcacactccaggcataggtaaagatctgttaggt
-350 gtggcttggatgaattcaagtatttggaatgaggacagccatag
-300 agacaagggcaggagagaggcgatttaatagatttatgccaatggctcc
-250 acttgagttctgataagaacccagaacccttggactccccagtaacatt
-200 gatttagttgttatgataacctcatagaata**TGAACT**caaagg**AGGTCA**g
-150 ttagtggtgtgtgtgattcttgccaaacttccaagggtggagaagcctc
-100 ttccaactgcaggcagagcacagtgccctgtactggctgcagctcca
-50 gccctgcctccttccttagcatataaacaatccaacacgcctcactgaatc
+1 **Actgctgtgcaggcaggaaagctccatgcacatagcccagcaaagagca**
+51 **acacagagctgaaaggaagactcagaggagagagataagtaaggaaagta**
+101 **gtgatggctctcatcccagacttggccatggaaacctggcttcctgc**
+151 **tgtcagcctggtgctcctctatctgtgagtaactgtccaggctccttc**
+201 tctgtttccttggacttgggtgctaattcaggcctctttcccttatct
+251 gtttgaagataaaaagatgtcaggccggcgtggcttacacct

Mit folgenden Primern konnte in der nachfolgenden PCR ein Amplikon erzielt werden (siehe unterstrichene Bereiche in der Basensequenz):

f-primer:

-390: 5'-ggcacaggcacactccaggcatagg-3'

r-primer:

+191: 5'-cctggacagttactcacagatagag -3'

11.3 Einfügen von Restriktionserkennungssequenzen

Damit die Amplikons nach PCR in die Plasmid-DNA eingefügt werden können, werden an die Primer Erkennungssequenzen für die gleichen Restriktionsenzyme eingefügt, welche auch das Plasmid schneiden. So werden in einem post-PCR-Verdau die gewünschten Sequenzen ausgeschnitten und können in einer anschließenden Ligation in das Plasmid eingefügt werden. Wichtig hierbei ist, dass die Enzyme nicht innerhalb des Amplikons schneiden dürfen. Dies wurde mit Nebcutter Version 2.0 überprüft (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). Außerdem sollten zur Erleichterung der anschließenden Ligation beim Schneiden *sticky ends* entstehen. Schließlich sollten beide Restriktionsenzyme unter gleichen Reaktionsbedingungen die gleiche Aktivität zeigen.

Diese Voraussetzungen erfüllten die Restriktionsenzyme *Hind*III und *Xhol*.

Erkennungssequenzen: HindIII: 5' A AGCTT 3'

3'-TTTCGA A-5'

*Xba*I: 5'-C TCGAG-3'

3'-GAGCT C-5'

Der zusätzliche Einbau einer *ccc-clamp* an das 5'-Ende der Restriktionsschnittstelle stabilisiert beim Annealing der PCR den Primer am Templat.

Folgende von Metabion (Metabion GmbH, Martinsried, Deutschland) bezogenen Sequenzen konnten schließlich in der anschließenden PCR amplifiziert werden:

FGF19:

f-primer mit *Xhol*-Restriktionsschnittstellen (blau) und *ccc-clamp* (grün):

- 1954: 5'-**ccc**ctcgagtcacacccatgagtgtacatc-3'
-882: 5'-**ccc**ctcgagtttgcaggaccgcttcatggag-3'
-532: 5'-**ccc**ctcgagcttcagggtgcacacag-3'
-301: 5'-**ccc**ctcgagaagaacctgagactgtcgaaactgc-3'

r-primer mit *HindIII*-Restriktionsschnittstellen (blau) und *ccc-clamp* (grün):

- +244: 5'-**cccaagctt**gagcatttttatcgggattgcattc-3'

CYP3A4:

f-primer mit *Xhol*-Restriktionsschnittstellen (blau) und *ccc-clamp* (grün):

- 390: 5'-**ccc**ctcgaggcacaggcacactccaggcatagg-3'

r-primer mit *HindIII*-Restriktionsschnittstellen (blau) und *ccc-clamp* (grün):

- +191: 5'-**cccaagctt**cctggacagttactcacagatagag -3'

11.4 PCR und Gelelektrophorese

Die PCR-Bedingungen waren:

Hold:	94 °C	5 min
Cycle (35x):	94 °C melting	40 s
	55 °C annealing	44 s
	72 °C elongation	1 min bzw. 2 min
Hold	72 °C	10 min

Bis auf das FGF19-Templat -1954/+244 konnten alle Konstrukte unter diesen Bedingungen amplifiziert werden. Für jenes längste Konstrukt musste die Elongationszeit auf zwei Minuten erhöht werden.

Für die anschließende Gelelektrophorese wurden die Amplikon-Lösungen mit Bromphenolblau gefärbt und in einem einprozentigen Agarosegel gegen einen sog. *ladder* mit DNA-Größenstandards im Elektrophoresebad (U: 90 V,

I: 400 mA, t: 45 min) aufgetrennt. So konnten die in der Lösung enthaltenen DNA-Fragmente unter UV-Licht auf ihre Größe hin untersucht und damit der Nachweis der Amplifizierung der gewünschten Konstrukte erbracht werden.

11.5 Restriktionsverdau und Ligation

Um die Konstrukte in das Plasmid einzufügen zu können, müssen sowohl die PCR-Produkte aus Kapitel 11.4 als auch das Plasmid einem Restriktionsverdau mit *Xhol* und *HindIII* unterzogen werden. Als Plasmid diente pGL3-basic (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland), die Restriktionsenzyme *Xhol* und *HindIII* sowie der zugehörige Puffer wurden von Roche (Roche, Mannheim, Deutschland) bezogen. Das Plasmid pGL3-basic enthält zum einen Restriktionsschnittstellen für verschiedene Endonukleasen. Weiterhin dient eine Region der Resistenz gegen Ampicillin zur Selektion transformierter von nicht transformierten Bakterien. Schließlich enthält das Plasmid die Gensequenz zur Synthese von Luciferase, und zwar den Restriktionsstellen nachgeschaltet (Abb. 6). So können putative Promotor-Regionen vor das Luciferase-Gen integriert werden. Werden Zellen mit diesen Reporter-Konstrukten transfiziert, wird bei entsprechendem Stimulus bei positiver Promotoraktivität Luciferase synthetisiert. Diese wiederum katalysiert eine Lichtemission nach Zugabe ihres spezifischen Substrates. So wird letztlich die Promotoraktivität mit einfachen Mitteln messbar.

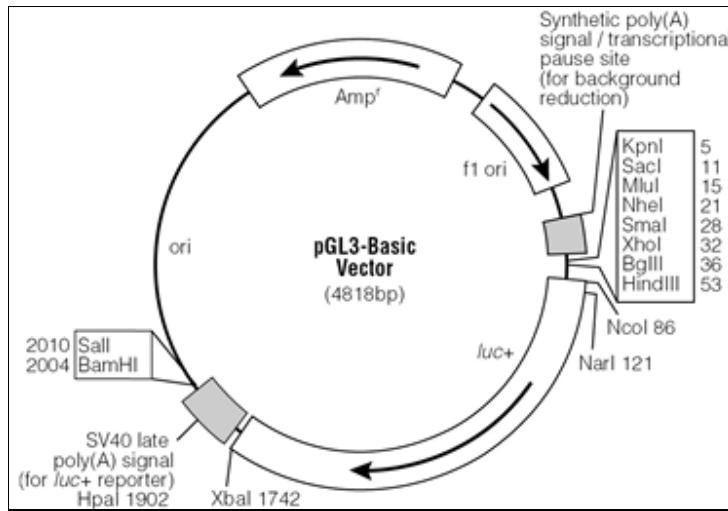


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Vektorplasmids pGL3-Basic
Erläuterungen im Text.

Restriktionsverdau:

0,5 µl <i>Xhol</i> (10 U/µl)	}	+ 10 µl Konstrukt-Lösung, 2 h Inkubation bei 37 °C
0,5 µl <i>HindIII</i> (10 U/µl)		
2 µl Puffer B		
7 µl Wasser		

Für die anschließende Ligation wurde der Ansatz nach der Inkubation mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend der Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Ligation:

1,0 µl Vektor-Plasmid (verdaut)	}	Inkubation über Nacht bei 14 °C
9,0 µl Insert		
1,5 µl Ligase		
4 µl 10x Puffer		
4,5 µl Wasser		

11.6 Klonierung der Reporter-Plasmide über die Transformation von Bakterien

Die Ligationsprodukte aus Kapitel 11.5 könnten bereits zur Transfektion der LS174T-Zellen verwendet werden, liegen aber zum einen gemischt mit unligierten DNA-Fragmenten und Plasmiden zusammen vor und würden zum anderen wegen der geringen Menge kaum Aussicht auf Erfolg haben.

Um die für die Transfektion großen Mengen an Reporter-Konstrukten zu erhalten, werden die Ligationsansätze mit kompetenten Bakterien zusammengebracht, welche wahllos jedes Plasmid aufnehmen. Auf Selektionsnährböden wachsen anschließend nur die Bakterien, bei denen die Transformation erfolgreich war. Um nur die Bakterienklone weiterzukultivieren, deren Plasmid auch ein Konstrukt enthält, werden zunächst mehrere Kolonien eines Ligationsansatzes subkultiviert. Anschließend werden deren Plasmide gewonnen, über Restriktionsverdau und Gelelektrophorese können schließlich die „richtigen“ Klone herausgefunden und vermehrt werden.

11.6.1 Transformation von kompetenten E. coli mit dem Ligationsprodukt

Material:

Ligationsansätze aus 11.5	11 µl
MAX Efficiency DH5alpha® (Invitrogen, Kalifornien, USA)	100 µl
S.O.C.-Medium	1 ml
(2% Tryptone	
0.5% Hefe Extrakt	
10 mM NaCl	
2.5 mM KCl	
10 mM MgCl ₂	
10 mM MgSO ₄	
20 mM Glukose)	

Schema:

- 100 µl DH5alpha-Zellsuspension wurden zum Ligationsansatz pipettiert
- Inkubation auf Eis für 30 min
- Anschließend 90 s Hitzeschock-Behandlung bei 42 °C
- Weitere Inkubation für 5 min auf Eis
- 1 ml S.O.C.-Medium wurde zum Inkubationsansatz pipettiert. Anschließend Inkubation für 60 min bei 37 °C zur Vermehrung der Bakterien.

Herstellung der Nähragar-Platten mit Ampicillin:

35 g Luria Bertani Agar (Sigma, St. Louis, USA) wurden in einem Liter Wasser gelöst und anschließend bei 121 °C 15 Minuten autoklaviert. Anschließend wurde der Lösung vor dem Erstarren steril-filtriertes Ampicillin (Sigma, St. Louis, USA) zugefügt, sodass eine Endkonzentration von 100 µg/ml Lösung entsteht. Diese Lösung wurde auf Petrischalen verteilt, wo sie schließlich erstarrte.

Zusammensetzung LB Agar-Lösung:

Trypton 10 g/L

Hefe Extrakt 5 g/L

NaCl 5 g/L

Agar 15 g/L

Nach einstündiger Inkubation wurden 100 µl jedes Bakterien-Ansatzes jeweils auf einen Nährboden pipettiert und mit einem Drigalski-Spatel verteilt. Der verbleibende Ansatz wurde zentrifugiert und anschließend ebenfalls auf einer LBamp-Platte ausgestrichen. Auf diese Weise wurden unterschiedliche Bakteriendichten ausplattiert, wodurch – je nach Erfolg der Transformation – die Chance auf Einzelkulturen erhöht wird.

Die beimpften Nährböden wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

11.6.2 Selektion der Bakterien mit Reporter-Plasmid durch das Miniprep-Verfahren

Material:

Kolonisierte LBamp-Petrischalen aus 11.6.1

1 bis 2 LBamp Agar-Nährboden

Autoklaviertes LB-Flüssigmedium (Sigma, St. Louis, USA) mit 100µl/ml sterilfiltriertem Ampicillin

Reagenzgläser

Schema:

- Jedes Petrischalen-Paar (hohe – niedrige Dichte) repräsentierte ein Promotor-Konstrukt. Aus jedem Paar wurde dasjenige ausgewählt, bei dem die Selektion einzelner Kolonien am leichtesten gelingt.
- Mit einer sterilen Pippettenspitze wurde eine beliebige Kolonie angepickt.
- Diese Pippettenspitze wurde auf einem weiteren Nährboden ausgestrichen, welcher als Replikaplatte diente. Genau beschriftet konnte diese Platte anschließend aufbewahrt und zur erneuten Anzucht der korrekt transformierten Bakterien verwendet werden.
- Anschließend wurde die Pippettenspitze zusammen mit 3 ml LBamp-Flüssigmedium bei 37 °C als Flüssigkultur auf einem Schüttler zwölf bis 16 Stunden inkubiert.
- Von jedem Nährbodenpaar wurden insgesamt vier Kolonien auf diese Weise verarbeitet. So stieg die Wahrscheinlichkeit, Bakterien mit Reporter-Plasmiden zu erhalten.
- Nach der Inkubationszeit wurden aus diesen Minipreps die Plasmide mit dem QIAprep spin Miniprep kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben isoliert und ein Kontrollverdau mit *Xhol* und *HindIII* durchgeführt.

- Die Verdau-Ansätze wurden mit Bromphenolblau gefärbt und auf einem Ethidiumbromid-Gel gegen einen DNA-Standard einer Gelelektrophorese unterzogen. Zeigte sich neben der Plasmidbande eine weitere Bande, welche größtmäßig dem Promotorkonstrukt entspricht, lag dem Verdau ein Reporter-Plasmid zugrunde. Nach Zuordnung zur ursprünglichen Kultur konnte diese nun zur weiteren Klonierung verwendet werden.

11.7 Sequenzierung der Reporterplasmide und Großkultur mittels Maxiprep-Verfahren

Um sicherzustellen, dass für die Transfektion nur die gewünschten Plasmide mit der richtigen Basensequenz eingesetzt wurden, folgte eine Sequenzanalyse der isolierten Plasmide, um die gewonnenen Plasmid-Sequenzen mit der vorausgesetzten Basenabfolge vergleichen und so verifizieren zu können. Letztlich diente dieser Schritt nochmals der Kontrolle des korrekten Einbaus der jeweiligen Deletionskonstrukte in das Plasmid.

Das Verfahren der eingesetzten zyklischen Sequenzierungsmethode arbeitet analog der Kettenabbruchmethode nach Sanger mithilfe von Didesoxynucleotiden. In einem ersten PCR-Schritt wird in einem Gemisch aus DNA-Sequenz, Sequenzierprimer, Nucleotidgemisch und DNA-Polymerase die Synthese eines komplementären DNA-Stranges initiiert. Das Nucleotidgemisch enthält neben den vier 2'-Desoxynucleotiden auch vier synthetische 2'-3'-Didesoxynucleotide, sogenannte Terminatornucleotide, die zum Abbruch der Elongation führen, da ihnen die OH-Gruppe am 3'-C-Atom fehlt. Der Einbau eines Didesoxynucleotides ist, abhängig von dem Konzentrationsverhältnis zu den 2'-Desoxynucleotiden, statistisch verteilt. Die Sequenzierung während der PCR-Amplifikation führt somit zu einem Satz von Amplifikationsfragmenten unterschiedlicher Länge, die alle mit einem Didesoxynucleotid enden. Die vier unterschiedlichen Didesoxynucleotide sind bei dem hier benutzten Verfahren mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, sog. Fluorophoren markiert. Die

einzelnen Fragmente werden anschließend mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt, wobei die jeweiligen Fluorophore durch einen Laser angeregt und so detektiert werden. Die Fragmentlänge kann hierbei auf eine Base genau ermittelt und so anhand der Folge der fluoreszenzmarkierten Didesoxynucleotide abschließend die Nukleotidsequenz der Amplifikationsprodukte bestimmt werden.

Für die PCR-Reaktion der zyklischen Sequenzierung wurde das Big Dye v1.1 Cycle Sequencing kit von Applied Biosystems benutzt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

PCR-Ansatz der Sequenzierung:

Plasmid-DNA	300ng
BigDye Sequenzierpuffer	2µl
Ready Reaction Premix Mix	4µl
Sequenzierprimer	3,2 pmol
ad 20µl H ₂ O dest.	

Sequenzier-PCR-Bedingungen:

1 min 96°C
10 s bei 96°C
5 s bei 50°C
4 s bei 62°C } 25 Zyklen

Temperatur bis zur Entnahme: 4°C

Anschließend wurde das Sequenz-PCR-Produkt mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt und schließlich sequenziert. Die jeweiligen Sequenzen konnten mit dem Programm Sequencher, Version 4.0.5 (Genes Codes Corporation, Michigan, USA) mit ihrer jeweiligen Ausgangssequenz verglichen werden.

Um letztlich ausreichende Mengen an Plasmiden für die erfolgreiche Transfektion der LS174T-Zellen gewinnen zu können, wurden obige Kulturen nach der Kontrollsequenzierung im sog. Maxiprep-Verfahren in 250 ml LBamp-Medium kultiviert und die Plasmide mit dem QIAprep spin Maxiprep kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß der Herstellerangaben isoliert. Mittels Photometrie im Nanodrop-Verfahren (Thermo Scientific NanoDrop® 1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) konnte schließlich die Endkonzentration der Plasmid-Lösung quantifiziert werden.

12 Transfektion und Stimulation der LS174T-Zellen

Als nächster und wichtigster Schritt folgte die Transfektion der Reporterplasmide in menschliche Zellen, nämlich in LS174T-Zellen. Denn nur in eukaryotem Zellmilieu lassen die anschließenden Ergebnisse aus den Stimulationsversuchen Rückschlüsse auf die zu untersuchenden Regulationsvorgänge zu. Zur Frage nach den geeigneten Stimulationsbedingungen konnte auf die bereits durchgeführten Versuche im Rahmen der Genexpressionsanalyse von FGF19 (siehe Kapitel 5 und 6) zurückgegriffen werden.

12.1 Transfektion der LS174T-Zellen mit den Deletionskonstrukt integrierten Reporterplasmiden

Zur Transfektion der LS174T-Zellen wurde in dieser Arbeit auf das FuGENE 6 transfection reagent (Roche, Mannheim, Deutschland) zurückgegriffen. Alle Arbeitsschritte basierten auf den Empfehlungen des Herstellers.

Zunächst wurden die in Kultur gehaltenen LS174T-Zellen nach einem splitting-Schritt so auf 6-Well-Platten verteilt, dass initial pro Well 10^6 Zellen eingesetzt wurden. Nach zwei Tagen Kultur sind 80 bis 90% des Well-Bodens bewachsen.

Nach Herstellerangaben und eigenen Erfahrungen wurde ein Ausgangsverhältnis FuGENE-Reagenz [μ l] zu Plasmidmenge [μ g] von 5:2 gewählt.

Nach Ablauf der Reaktionszeit von FuGENE-Reagenz und Plasmiden wurden die Reaktionslösungen unter sterilen Bedingungen tropfenweise in jedes einzelne Well der 6-Well-Platten pipettiert. Anschließend wurden die Zellen drei Stunden lang inkubiert.

12.2 Single-Plasmid-Transfektion

Um herauszufinden, ob und wo PXR als Heterodimer mit RXR vor das FGF19-Gen bindet und so die Transkription initiiert, wurden in einer ersten Versuchsreihe die LS174T-Zellen jeweils nur mit einem einzelnen Reporterplasmid mit Deletionskonstrukt transfiziert. Als Promotor-Positivkontrolle wurde ein Deletionskonstrukt mit der proximalen Promotorregion von CYP3A4 eingesetzt, zur Erfolgskontrolle der Transfektion wurde als interner Standard mit pGL3-control transfiziert, ein Vektor, wo dem Luciferase-Gen die Promotor- und Enhancerregion des *simian virus 40* (SV40) vorgeschaltet ist, welcher in vielen Säugetierzellen stark prozessiert wird (konstitutive Expression). Demgegenüber als Negativ-Kontrolle wurde mit pGL-basic transfiziert, welcher weder einen Promotor noch eine Enhancer-Sequenz enthält.

Folgende Deletionskonstrukt-Reporterplasmide bzw. Kontrollplasmide wurden eingesetzt:

CYP3A4-Deletionskonstrukt -390/+191
FGF19-Deletionskonstrukt -301/+244
FGF19-Deletionskonstrukt -532/+244
FGF19-Deletionskonstrukt -882/+244
FGF19-Deletionskonstrukt -1954/+244
pGL3-basic als Negativkontrolle
pGL3-control als Positivkontrolle



jeweils 2 µg

Die Stimulationsbedingungen wurden analog zur Genexpressionsanalyse wie folgt gewählt: LCA pro Well 250 µmol/l, Rifampicin pro Well 10 µmol/l und

Kontrolle. Jedes Experiment wurde in Triplikaten ausgeführt, der Versuchsabbruch erfolgte nach 24 Stunden.

12.3 Co-Transfektion mit pSG5-hPXR und pSG5-hRXR

Um die These näher zu unterstreichen, dass PXR zusammen mit RXR als Heterodimer eine Schlüsselrolle bei der Transkription vom FGF19 spielt, wurden in einer zweiten Versuchsreihe die vier FGF19 Deletionskonstrukt-Plasmide zusammen mit für RXR und PXR codierenden Plasmiden cotransfiziert, nämlich mit pSG5-hPXR und pSG5-hRXR⁴³. Als Kontrolle diente ein größtmäßig ähnlicher Leervektor, nämlich pcDNA3.1/TOPO. Dadurch ergaben sich folgende Bedingungen:

(FGF19-Konstruktplasmid + pSG5-hPXR + pSG5-hRXR), jeweils 0,67 µg

(CYP3A4-Konstruktplasmid + pSG5-hPXR + pSG5-hRXR), jeweils 0,67 µg

FGF19-Konstruktplasmid 0,67 µg + pcDNA3.1/TOPO 1,33 µg

CYP3A4-Konstruktplasmid 0,67 µg + pcDNA3.1/TOPO 1,33 µg

pGL3-basic als Negativkontrolle 2 µg

pGL3-control als Positivkontrolle 2 µg

Die Stimulationsbedingungen wurden analog zur Genexpressionsanalyse wie folgt gewählt: LCA pro Well 250 µmol/l, Rifampicin pro Well 10 µmol/l und Kontrolle. Jedes Experiment wurde in Triplikaten ausgeführt und nach 24 Stunden vermessen.

13 Ernten der Zellen und Messung der Luciferase-Aktivität

Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen unter Verwendung des Luciferase Assay Systems (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers⁴⁴ zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Zell-Lyse mit lediglich 250 µl

Lysis-Puffer, um die Konzentration an Enzym in der Lösung zu erhöhen. Nach 15minütiger Inkubation wurde das Lysat zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte in einem LUMAT LB9501 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) mit 100 µl Lysat-Überstand unter Zugabe von 300 µl Luciferin-Lösung. Das Messergebnis wurde in relativen Luciferase Einheiten (*relativ luciferase units*, RLU) ausgegeben.

14 Analyse der PXR Bindungsmotive

Die Basensequenzen für Promotor und die Transkriptionsstartstelle von CYP3A4 und FGF19 wurden mit Hilfe eines *in silico*-Ansatzes zum einen über das Programm DBTSS (database of transcription start sites, http://elmo.ims.u_tkyo.ac.jp/dbtss)⁴⁵, zum anderen über *Gene to Promoter* (Genomatix GmbH, München, Deutschland) abgerufen. Über NUBIscan⁴⁶ und eine selbst definierte Matrix, basierend auf bekannten PXR-Zielgenen³¹, konnten Vorhersagen über mögliche Bindestellen für PXR in der Regulatorregion von FGF19 getroffen werden.

III Ergebnisse

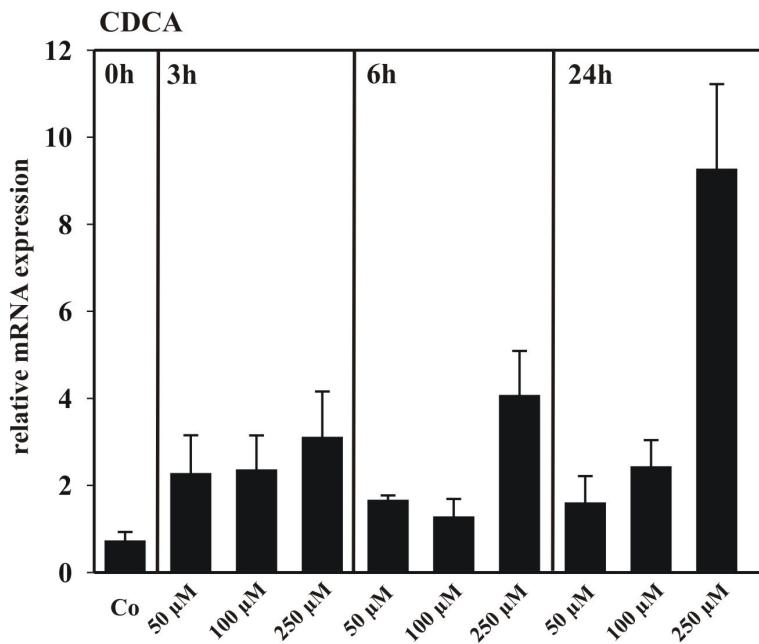
15 In intestinalen LS174T-Zellen wird FGF19 durch PXR-Induktoren (Rifampicin und LCA) induziert

In vorausgegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass FGF19 in Hepatozyten und in Darmzellen der Zelllinie CaCo2 nach Stimulation sowohl mit dem starken, synthetischen FXR-Agonisten GW4064 als auch durch den natürlichen FXR-Agonisten Chenodeoxycholsäure hochreguliert wird. In dieser Arbeit sollte zunächst der Nachweis erbracht werden, dass FGF19 auch durch die sekundäre Gallensäure LCA stimuliert wird, einem natürlichen Agonisten für PXR. Hierfür wurde in einer Genexpressionsanalyse die mittlere RNA-Expression von FGF19 nach Stimulierung mit ansteigenden Konzentrationen von CDCA und LCA (jeweils 50, 100 und 250 µM) nach verschiedenen Reaktionszeiten mittels Taqman real-time RT-PCR gemessen. Das Studiendesign beinhaltete zunächst die Stimulationsreihe mit dem bekannten FGF19-Induktor CDCA, um nachzuweisen, dass LS174T ein suffizientes Modell für die nachfolgenden Versuche mit LCA darstellt. Wie Abb. 7A zeigt, erhöhen sämtliche Konzentrationen CDCA in Abhängigkeit von der Zeit die relative mRNA-Expression von FGF19. Dabei findet sich die höchste Stimulation bei einer Konzentration von 250 µM nach 24 Stunden; somit zeigt sich eine direkte Abhängigkeit der relativen FGF19-mRNA-Expression von Zeit und CDCA-Konzentration. Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass LS174T für unsere Ziele ein geeignetes Modell der FGF19-Stimulation war.

Entsprechend wurde in einem nächsten Versuch eine Stimulationsreihe mit LCA unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt (Abb. 7B). Hier konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass die relative FGF19-mRNA-Expression durch die höchste verwendete Konzentration an LCA, also 250 µM, bei allen drei Zeitintervallen deutlich steigt, am meisten nach 24 Stunden. Dies macht klar, dass der PXR-Induktor LCA FGF19 in LS174T-Zellen hochreguliert, in vergleichbarer Weise wie CDCA. Dabei konnten wir schon zuvor

nachweisen, dass LS174T-Zellen im Gegensatz zu CaCo2 und HT-29 auch für die weiteren Schritte der Detoxifikation eine hohe Expression für PXR abhängige Detoxifizierungsenzyme aufweisen.³¹ Die Effektivität dieses Systems zeigte sich in der relativen FGF19-mRNA-Expression nach 48 Stunden bei sonst gleichen Grundbedingungen: Nach dieser Zeit war die relative Expression im Vergleich zu den 24-Stunden-Werten bereits wieder signifikant abgesunken, was impliziert, dass nach 48 Stunden ein Großteil der zellschädigenden Substanzen abgebaut worden ist (Daten nicht gezeigt). Eine weitere Datenreihe mit 500 µM LCA (Daten nicht gezeigt) machte deutlich, dass unter diesen Bedingungen die toxischen Effekte von LCA die Detoxifizierungsmechanismen der Zellen überwogen.

A



B

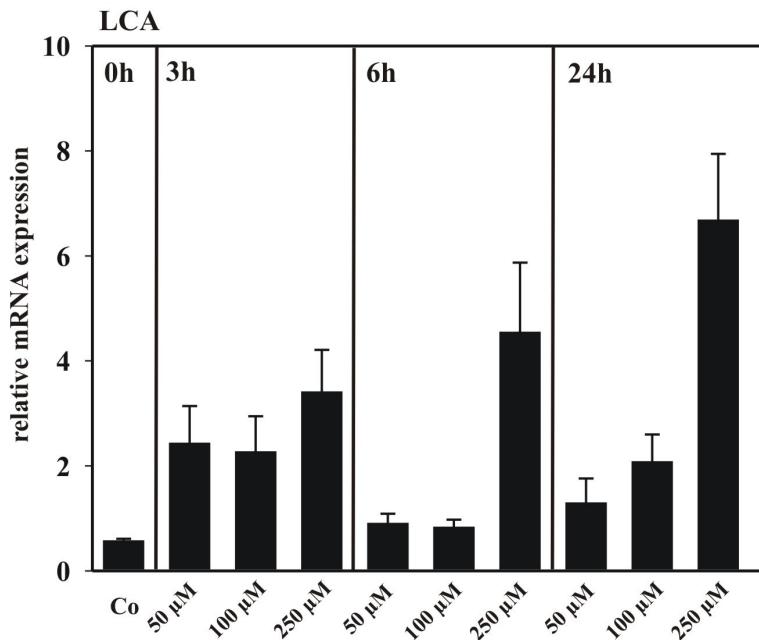


Abbildung 7: Die mRNA-Induktion von FGF19 in LS174T durch CDCA (A) und LCA (B) (Mittelwerte +/- Standardabweichung, t-Test nach Student). P < 0,05 zwischen den 3h-, 6h- und 24h-Gruppen einerseits und der 0h-Gruppe andererseits sowohl in A als auch in B.

16 Ein PXR responsives Element von FGF19 liegt innerhalb des kleinsten Deletionskonstruktes von -301 bp upstream bis +244 bp downstream

Als nächstes stellte sich die Frage, wo auf dem FGF19-Gen ein PXR responsives Element sitzt. Obwohl bereits ein FXR responsives Element auf dem zweiten Intron von FGF19 beschrieben wurde³⁶, konzentrierten wir unsere Suche nach einem PXR responsiven Element auf den Bereich -2000 bp upstream des ersten Introns. Zwar hätte theoretisch auch die Möglichkeit bestanden, dass FGF19 via FXR von LCA hochreguliert wird. Allerdings wurde LCA als Antagonist von FXR beschrieben⁴⁷, sodass dieser Mechanismus eher unwahrscheinlich erschien. Um herauszufinden, wo ein mögliches, PXR responsives Element als Promotor für FGF19 liegt, wurden in einem nächsten Versuch die LS174T-Zellen mit Luciferase-Reporterplasmiden mit unterschiedlichen Deletionskonstrukten transfiziert. Wie im Abschnitt „Material und Methoden“ ausgeführt, kam als Positivkontrolle die proximale PXR-Bindestelle von CYP3A4 zum Einsatz, welche in Position -161 ein ER6-Element enthält. Dieses Deletionskonstrukt reichte von -390 bis +191. FGF19-Deletionskonstrukte waren -301/+244, -532/+244, -882/+244 und -1954/+244. Als interner Standard fungierte als Positivkontrolle pGL3-control, als Negativkontrolle pGL3-basic. Stimuliert wurde mit den bekannten PXR-Induktoren LCA in einer Konzentration von 250 µM und Rifampicin in einer Konzentration 10 µM über 24 Stunden, eine unstimulierte Kohorte diente als Kontrolle. Alle Versuche wurden in Triplikaten ausgeführt. Die Höhe der anschließend gemessenen relativen Luciferase Einheiten (RLU) spiegelte indirekt die Transkriptionsaktivität des einzelnen Deletionskonstrukt wider (Abb. 8).

Zunächst konnten wir feststellen, dass die Promotoraktivität des CYP3A4-Konstrukt mit dem proximalen responsiven Element zwar relativ klein war, aber signifikant über der Hintergrundsaktivität lag. Dabei verursachte nur der starke PXR-Aktivator Rifampicin diese Stimulation nach 24 Stunden, wohingegen LCA keinen Effekt verursachte. Der Umstand, dass zur Stimulation von CYP3A4 über PXR ein zweites Element benötigt wird,

welches ca. 8 kB weiter distal des proximalen Elementes liegt (sog. distales Enhancer-Element), konnte bereits gezeigt werden⁴⁸ und liegt vermutlich auch hier zugrunde.

Für die FGF19-Deletionskonstrukte konnten wir nachweisen, dass bei allen Konstrukten sowohl durch Rifampicin als auch durch LCA eine deutliche Promotoraktivität zu verzeichnen war. Am deutlichsten trat dies beim längsten Deletionskonstrukt -1954/+244 in Erscheinung, doch auch beim kurzen Fragment -301/+244 zeigte sich eine deutliche Stimulation. Daraus können zwei Schlüsse gezogen werden: Zum einen ist die Wahrscheinlichkeit, dass das FGF19-Deletionskonstrukt -301/+244 ein Element besitzt, welches auf Rifampicin und LCA responsiv reagiert, sehr hoch. Zum anderen wird klar, dass zwischen ca. -1000 und -2000 bp upstream weitere Enhancer-Elemente liegen müssen, welche die Transkriptionsaktivität um ein Mehrfaches erhöhen.

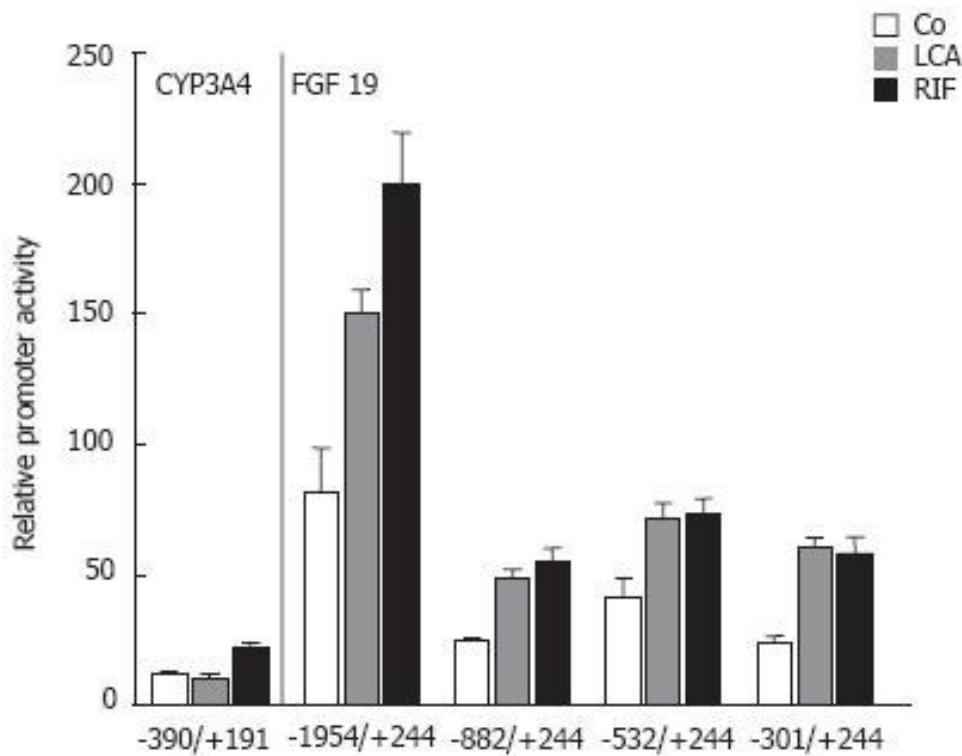


Abbildung 8: Lokalisierung des LCA/Rifampicin und damit PXR responsiven Elementes in der FGF19-Promotorregion

Relative CYP3A4- und FGF19-Promotoraktivität von LS174T-Zellen nach 24h-Inkubation mit LCA (250 µM, grau) und Rifampicin (10 µM, schwarz) verglichen mit einer Kontrollgruppe (weiß). (Mittelwerte +/- Standardabweichung). P < 0,05 zwischen den LCA- und Rifampicin-Gruppen einerseits und der Kontrollgruppe andererseits.

17 Das proximale PXR responsive Element von FGF19 wird durch PXR/RXR-Heterodimere stimuliert

Im Abschnitt „Einführung“ wurde erläutert, dass PXR zusammen mit RXR als Heterodimerenpaar an sein *response element* bindet. Wir stellten also die These auf, dass durch Co-Stimulation der Zellen mit PXR und RXR codierenden Plasmiden die Luciferase-Aktivität höher liegen müsste als ohne. Hierfür verwendeten wir folgenden Versuchsansatz: Neben der o.g. Transfektion mit den Deletionskonstruktplasmiden wurde in einem parallelen Ansatz zusätzlich mit pSG5-hPXR und pSG5-hRXR co-transfiziert. Um die Menge an eingesetztem Plasmid gleich zu halten und so vergleichbare Bedingungen zu schaffen, machte jedes Plasmid in der Co-Transfektion ein

Drittel der Gesamtmenge aus; in der Single-Transfektion wurde neben dem Deletionskonstruktplasmid ein größtmäßig gleicher Leervektor eingesetzt. Über die Werte aus der Single-Plasmid-Transfektion und der Kontrollgruppe (Stimulation ohne Transfektion) wurden die Ergebnisse aus der Co-Transfektion normalisiert und zugleich die relative Promotorinduktion berechnet.

Abb. 9 zeigt, dass eine Überexpression von RXR und PXR zu einem deutlichen Anstieg der relativen Promotoraktivität führt. Dabei führte wie erwartet die Stimulation mit Rifampicin zu weitaus höherer Promotorinduktion als mit LCA. Interessanterweise war bereits auf dem kleinsten Deletionskonstrukt eine Induktion durch die beiden Liganden erkennbar. Dieses Ergebnis stützt zum einen das Resultat aus Kapitel 16, nämlich dass auf dem kleinsten Deletionskonstrukt ein PXR responsives Element sitzt. Zum anderen wird hierdurch die These untermauert, dass es tatsächlich PXR/RXR-Heterodimere sind, welche am kleinsten Deletionskonstrukt binden.

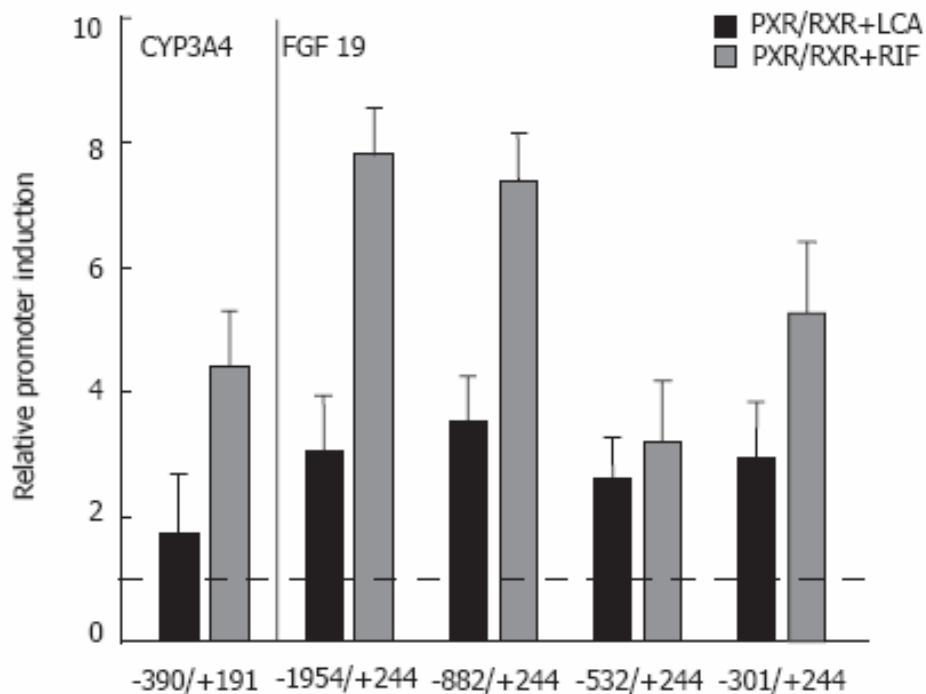


Abbildung 9: Transfektion mit Deletionsplasmiden definierter Länge und Kotransfektion mit hPXR und hRXR

Relative CYP3A4- und FGF19-Promotoraktivität von LS174T-Zellen nach 24h-Inkubation mit LCA (250 µM, grau) und Rifampicin (10 µM, schwarz) unter Kotransfektion mit hPXR und hRXR. Zur Normalisierung und Berechnung der relativen Promotor Aktivität dienten die Teilergebnisse aus der Stimulation mit einem Leervektor und aus der Kontrollgruppe ohne Plasmid. (Mittelwerte +/- Standardabweichung, t-Test nach Student). Die gestrichelte Linie zeigt die Schwelle zur signifikanten Promotorinduktion. P < 0,05 zwischen den hPXR/hRXR-Gruppen und LCA/Rifampicin-Kontrollgruppe sowie zwischen Leervektor und LCA/Rifampicin-Gruppe.

18 Bei -72 bp und -170 bp upstream des 1. Introns von FGF19 liegen zwei PXR-Bindemotive

Nachdem wir zeigen konnten, dass auf unserem kleinsten Deletionskonstrukt ein Rifampicin/LCA responsives Element liegen muss, führten wir eine Strukturanalyse dieses Konstruktes durch, um das Vorhandensein einer nunmehr wahrscheinlichen PXR-Bindestelle auf Nukleotidebene zu erkennen. Im Gegensatz zu FXR/RXR-Heterodimeren, die hauptsächlich an *inverted repeats* mit einem Nukleotid als *spacer* binden ($AG^G/TxTCA$),

können PXR/RXR-Elemente an unterschiedliche Elemente binden, so an *direct repeats* (DR3, DR4, DR5), *everted repeats* (ER6, ER8) oder *inverted repeats* (IR0).⁴⁹

Wie im Abschnitt „Material und Methoden“ ausgeführt, benutzten wir eine selbstdefinierte Matrix aus insgesamt 17 bislang nachgewiesenen PXR-Bindemotiven und führten mithilfe von NUBIScan einen Scan unseres Deletionskonstruktes FGF19 -301/+244 aus. Dadurch konnten wir zwei mutmaßliche Binderegionen auf dem Konstrukt festlegen, nämlich an Position -72 bp upstream ein ER6-Element und an Position -170 bp upstream ein DR3-Element (Abb. 10).

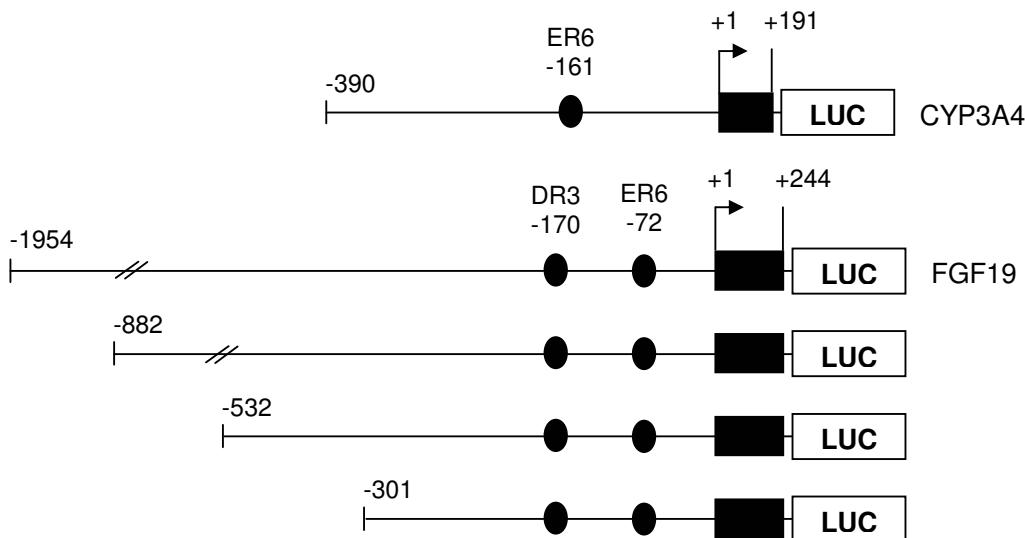


Abbildung 10: Schematische Darstellung der verwendeten Deletionskonstrukte sowie der nachgewiesenen (CYP3A4) und putativen (FGF19) *response elements* für PXR
Die jeweiligen Positionen sind relativ zum Transkriptionsstartpunkt.

19 Das ER6-Element ist zwischen Mensch und Maus konserviert

Vergleicht man den entsprechenden Bereich der humanen FGF19-Sequenz mit der korrespondierenden Sequenz des murinen Homologs FGF15 zeigt sich, dass das ER6-Element zwischen beiden Spezies konserviert ist (Abb. 11). Dementsprechend ist das ER6-Element der wahrscheinlichere Kandidat für ein PXR responsives Element. Allerdings sollten hierbei die Unterschiede zwischen einzelnen Spezies bei der PXR vermittelten Genexpression berücksichtigt werden.⁵⁰

		— DR 3 —
FGF19 -208	GGAGGGAGTGCAGTGGGCTTTAAGGGGA	AGGGCActaAGCCCGAGGTGAGGCTTCCCACAGAGGGTGA
fgf 15	GTAGGATCTGCGATAGCGTGCTAAAGGAGAGATTCAAGACTCAA-----	-----ACAGGGGGCTA
		— ER 6 —
FGF19 -138	AAAACCGTGCCCCCAACCTCTGGCCCG	TGCCCCacgcccAGTGCA TCCACTGGGAGCCTGAGGCCTGG
fgf 15	AGAGCTCTGCGTGCCTTAGTCTGTGACTGTCCCACGCGCATCCCT	---CTGAAAGCCCAGGGCTGG

Abbildung 11: Sequenzvergleich der homologen Regionen zwischen dem humanen FGF19-Promotor und dem murinen fgf15-Promotor

Die Positionen des DR3-Elements einerseits und des ER6-Elements andererseits sind fett markiert.

IV Diskussion

20 LCA beeinflusst FGF19 und den enterohepatischen Gallensäurekreislauf durch einen direkten PXR-abhängigen Mechanismus

Wie in Kapitel 4 gezeigt, kann der Gallensäurestoffwechsel der Leber bereits vom Darm aus via FGF15 (FGF19) reguliert werden: In einer negativen Feedback-Schleife verursachen Gallensäuren die Induktion von FXR, wodurch via Hochregulation von FGF19 im Darm, Transport via Pfortader und FGF4-Rezeptor am Hepatozyt die Transkription von CYP7A1 reprimiert wird.¹⁵ Außerdem ist FGF19 wahrscheinlich am Wiederauffüllen der Gallenblase beteiligt und wäre somit ein Gegenspieler zu Cholezystokinin.²² Die Ergebnisse unserer Arbeit haben gezeigt, dass auch LCA als natürlicher Ligand von PXR FGF19 in Zellen der Linie LS174T hochreguliert. Damit ist PXR möglicherweise auch an der intestinalen Kontrolle des Gallensäuremetabolismus beteiligt. Durch diesen Mechanismus wäre es der Leber möglich, auf die Akkumulation sekundärer Gallensäuren im Darm ebenfalls mit einer verminderten Gallensäureproduktion zu reagieren.

21 Xenobiotika als PXR-Agonisten wirken als Stellgrößen in der Gallensäurehomöostase

PXR ist bei der Detoxifizierung von Xenobiotika im Darm und in der Leber beteiligt: Eines der wichtigsten PXR-Zielgene zum Abbau von Xenobiotika ist CYP3A4 als Phase-1-Enzym. Aber auch Enzyme von Phase-2-Reaktionen sowie Transportproteine zum Ausschleusen der Xenobiotika-Metabolite werden über PXR angesteuert.

In unserer Studie griffen wir auf den bekannten und starken PXR-Induktor Rifampicin zurück. Andere PXR-Induktoren sind beispielsweise Tamoxifen, Nifedipin, Clotrimazol, Mifepriston, Phenobarbital, Johanniskraut oder Ritonavir.⁵¹ Legt man die Ergebnisse unserer Arbeit zugrunde, so wäre es PXR-Agonisten möglich, in den Gallensäuremetabolismus vom Darm aus einzugreifen. Sinn dieses Mechanismus könnte sein, dass bei Auftreten von

Xenobiotika im Darm via FGF19 die weitere Exkretion von Gallensäuren in den Darm reprimiert wird, sodass Detoxifizierungsvalenzen in Darm und Leber vorzugsweise dem Abbau von Xenobiotika zur Verfügung stehen (Abb. 12).

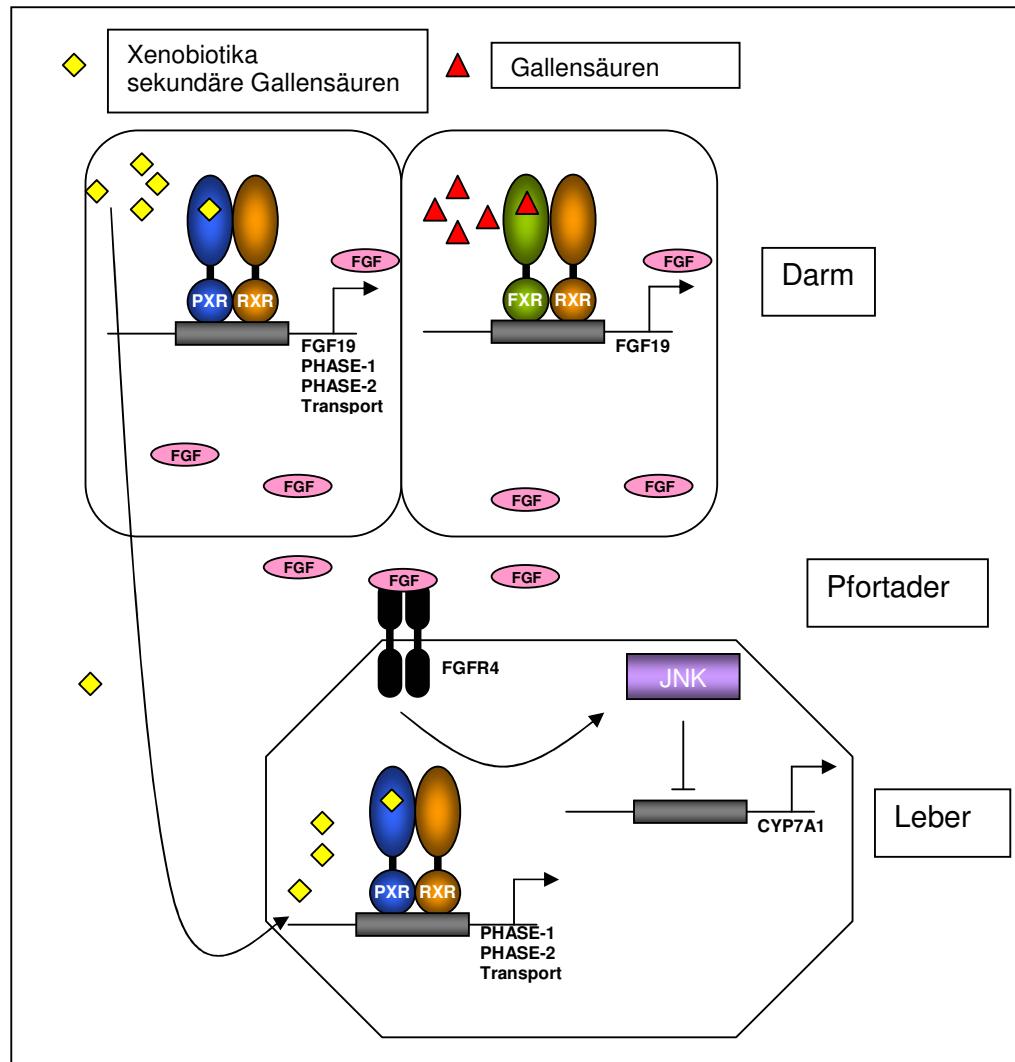


Abbildung 12: Modell zur Funktion von FXR und PXR als Repressoren der Gallensäuresynthese via enterohepatischem Kreislauf

In Ergänzung zu Abbildung 5 wird hier die mögliche Bedeutung von PXR als zusätzlicher Signalweg zur Modifikation des Gallensäuremetabolismus über Xenobiotika dargestellt. Einzelheiten in den Kapiteln 4 und 21 (modifiziert nach [38]).

22 Auswirkungen von Inflammation auf PXR-Zielgene

Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe sowie anderer Forscher ergaben, dass die PXR-Spiegel in Darmzellen von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen signifikant niedriger sind als in Kontrollprobanden. Entsprechend liegen die Zielgene von PXR (Gene der Detoxifizierungskaskade) ebenfalls in erniedrigter Menge vor. Genvarianten von PXR sind mit dem Auftreten von CED verknüpft. Insofern wäre eine Bestimmung der FGF19-Spiegel in Patienten mit CED interessant, da die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hinweisen, dass FGF19 ebenfalls ein Zielgen von PXR ist.

Der direkte Zusammenhang von PXR mit inflammatorischen Mechanismen im Intestinaltrakt konnte jüngst gezeigt werden: Bei PXR-Knockout-Mäusen zeigte sich eine Überstimulierung von NF-κB-Zielgenen. NF-κB ist ein Schlüsselregulator in Zusammenhang mit der Initiation von Entzündungen sowie innerhalb der angeborenen und erworbenen Immunität. Es wird normalerweise durch ein Inhibitorprotein im Zytoplasma solange in seiner Wirkung unterdrückt, bis bestimmte Stimuli, z.B. proinflammatorische Zytokine, reaktive Sauerstoffderivate oder virale Produkte, zur Degradation des Inhibitorproteins und damit zur Freisetzung von NF-κB führen. NF-κB wandert dann in den Zellkern und führt zur Aktivierung seiner Zielgene. PXR-Agonisten führen zur Unterdrückung der NF-κB-Wirkung. Interessanterweise führt umgekehrt die Aktivierung von NF-κB zu einer Supprimierung von PXR und somit von dessen Zielgenen.³³

Es ist denkbar, dass die NF-κB vermittelte Unterdrückung von PXR (also bei entzündlichen Prozessen) auch in die PXR vermittelte Aktivierung von FGF19 eingreift.

Der supprimierende Einfluss von Inflammation auf PXR-Zielgene und vermutlich auch auf FGF19 konnte somit gezeigt werden. Da jedoch FGF19 auch ein Zielgen von FXR ist, würde sich eine PXR-Suppression

möglicherweise nicht oder kaum auf die Signalfunktion von FGF19 zwischen Darm und Leber auswirken.

23 Auswirkungen von PXR-Aktivatoren auf mögliche systemische Effekte von FGF19

Da eine Hochregulation von FGF19 im Darm via PXR wahrscheinlich ist, stellt sich die Frage, ob außerhalb des Systems Darm – Pfortader – Leber eine systemische Wirkung von FGF19 zu erwarten ist, und wenn ja, wo sich diese Auswirkungen zeigen.

So konnte gezeigt werden, dass in transgenen Mäusen eine Überexpression von FGF19 im Vergleich zum Wildtyp zu schlankem Phänotyp – hauptsächlich über den Verlust von weißem Fettgewebe – führte. Die transgenen Mäuse fraßen mehr, hatten aber auch eine erhöhte Stoffwechselrate, welche von Leptin, IGF-1, Wachstums- oder Schilddrüsenhormonen unabhängig war. Auch nach zwölfwöchiger Fütterung von fettreicher Nahrung hielten die transgenen Mäuse ihr Gewicht konstant und zeigten weniger Steatose in Leber- oder Muskelgewebe. Außerdem hatten diese Mäuse geringere Glukose- und Insulinspiegel sowie eine erhöhte Sensitivität für Glukose und Insulin.⁵² Ähnliche Effekte konnten durch die Gabe von rekombinantem FGF19 an FVB-Mäusen beobachtet werden.⁵³

Sowohl bei transgenen Mäusen als auch nach Gabe von rekombinantem FGF19 an FBV-Mäuse zeigte sich eine Erhöhung der hepatzellulären Proliferation bis hin zum hepatzellulärem Karzinom.⁵⁴

Beide o.g. Effekte müssen jedoch unter der Frage betrachtet werden, inwieweit die Ergebnisse der Wirkung von FGF19 in Mäusen auf den Menschen übertragbar sind. Für die systemische Wirkung ist entscheidend, ob im Darm produzierter FGF19 nach *first-pass* durch die Leber überhaupt systemisch wirken kann.

Zweifelsohne zeigen diese Ergebnisse, dass die Bedeutung von FGF19 weiter beleuchtet werden muss. Ob eine therapeutische Konsequenz aus einer PXR vermittelten Aktivierung von FGF19 resultiert, bleibt abzuwarten.

V Zusammenfassung

Fragestellung: Bislang war bekannt, dass FXR-Agonisten, z.B. CDCA, einen positiven regulierenden Effekt auf die Synthese von FGF19 ausüben. Wir stellten uns zum einen die Frage, ob auch PXR-Agonisten, wie Rifampicin oder LCA, in intestinalen Zellen FGF19 hochregulieren. Zum anderen sollte anschließend die PXR responsive Promotorregion des FGF19-Gens näher charakterisiert werden.

Methoden: Im ersten Schritt wurden LS174T-Darmzellen mit verschiedenen Konzentrationen zum einen des typischen FXR-Agonisten CDCA als Positivkontrolle, zum anderen mit den PXR-Agonisten LCA in einer Zeitreihe stimuliert. Anschließend wurde mit Taqman real-time RT-PCR die relative mRNA-Expression von FGF19 bestimmt.

Im zweiten Schritt wurden verschiedene Deletionskonstrukte der FGF19-Promotorregion in Luciferase-Reporterplasmide integriert. In anschließenden Stimulationen mit Rifampicin und LCA wurde die Reaktion auf Rifampicin und LCA mittels *luciferase assays* gemessen.

In einem dritten Schritt wurden die Stimulationsansätze um Co-Transfektion mit den Expressionsplasmiden pSG5-hPXR und pSG5-hRXR erweitert.

Ergebnisse: Sowohl CDCA als auch LCA regulieren FGF19 dosis- und zeitabhängig hoch. Mithilfe von *luciferase assays* und verschieden langer Deletionskonstrukte konnten zwei mögliche proximale PXR-Binderegionen im FGF19-Gen identifiziert werden. Schließlich zeigten Rifampicin- und LCA-Stimulationen bei gleichzeitiger Überexpression von PXR und dessen Dimerisationspartner RXR eine deutliche Induktion der FGF19-Promotoraktivität.

Schlussfolgerung: Es ist wahrscheinlich, dass LCA in einer negativen Feedback-Schleife durch PXR die Expression von FGF19 induziert und so über den enterohepatischen Kreislauf in die Regulation der Gallensäuresynthese eingreift.

VI Danksagung und Lebenslauf

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die tatkräftige Mithilfe und Unterstützung einiger Personen nicht möglich gewesen. Folgenden möchte ich an dieser Stelle meinen besonderen Dank aussprechen:

PD Dr. rer. nat. Thomas Langmann, der mich in die Arbeitsgruppe aufgenommen und die Arbeit von der initialen Hypothese bis zur endgültigen Version exzellent betreut hat. Ihm gilt dafür mein besonderer Dank!

Prof. Dr. med. Gerd Schmitz, der als Direktor des Instituts für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin die Durchführung der Arbeit ermöglicht hat.

Dr. Susanne Heimerl, Dr. Christoph Möhle und Dr. Gerhard Liebisch für ihre Ratschläge und das Teilen ihrer Erfahrung.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, insbesondere Bettina Hartl, Manfred Haas und Wolfgang Hauer für ihre Zeit bei Einarbeiten, Geräteeinweisen und Beibringen der einzelnen Arbeitsschritte.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mein Medizinstudium möglich gemacht haben und meiner Frau Karin für die vielen Stunden an Computer und Rotstift.

Wolfgang Franz-Josef Wistuba
Valentin-Kindlin-Str. 2
86899 Landsberg am Lech
Email: wi-wo@web.de



Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum: 08.09.1980
Geburtsort: Vilsbiburg/NB

Ausbildung

1987 – 1991	Grundschule Marklkofen
1991 – 2000	Gymnasium Dingolfing
10/2001 – 11/2007	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg

Zivildienst

10/2000 – 08/2001	Krankenhaus der Barmherzigen Brüder in Regensburg Abteilung: Geriatrische Rehabilitation
-------------------	--

Praktisches Jahr

28.08.06 – 17.12.06	Wahlfach Psychiatrie an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie im Bezirksklinikum Regensburg Chefarzt: Prof. Dr. med. H. Klein
18.12.06 – 08.04.07	Chirurgie an der Klinik für Chirurgie im Caritas-Krankenhaus St. Josef, Regensburg Chefarzt: Prof. Dr. med. R. P. Wirsching
09.04.07 – 29.07.07	Innere Medizin am Klinikum Passau Chefärzte: Prof. Dr. med. M. Wettstein Prof. Dr. med. X. Elsner

Berufserfahrung

seit 12/2007	Weiterbildungsassistent zum Facharzt für Innere und Allgemeinmedizin Medizinische Klinik 1 (Gastroenterologie, Hepatologie, Endokrinologie, Diabetologie, Onkologie, Hämatologie) am Klinikum Kaufbeuren Chefarzt: Dr. med. M. Strobel
--------------	--

Sonstige Qualifikationen

Fremdsprachen	Englisch fließend in Wort und Schrift
Studienbegleitende Kurse	Ultraschallkurs für PJ'ler, Klinische Radiologie, Palliativmedizin, Kindersonographie und Kinderneurologie, PJ-Tutorium „Fit für die Praxis“

Außeruniversitäre fachliche Aktivitäten

Übersetzertätigkeit für die DGKL (Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V.) zur Etablierung des deutschen Online-Recherchesystems **www.labtestsonline.de**.

Rückfragen an: Prof. Dr. med. M. Klouche, Bremer Zentrum für Laboratoriumsmedizin, Bremen

Hobbys

Kirchenmusik (nebenamtlicher Organist, Chorsänger), Lesen, Gärtnern, Berg Wandern, Ski Fahren

Landsberg, den 16. September 2009

VII Quellenverzeichnis

- ¹ Chiang J. Y. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J. Hepatol.* 40, (2004) 539-551
- ² Chiang J. Y. Bile Acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors. *Endocr. Rev.* 23 (2002) 443-463
- ³ Chiang J. Y. Bile Acid regulation of hepatic physiology: III. Bile acids and nuclear receptors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284 (2003) G349-G356
- ⁴ Giguère V. Orphan nuclear receptors. From gene to function. *Endocrine Review* 20 (5) (1999), 689-725
- ⁵ Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K. et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83 (1995) 835-839
- ⁶ Wolbold, R. Untersuchungen zur Expression des Cytochrom P450 3A4 und zur Expression und transkriptionellen Regulation des Pregnan-X-Rezeptors im Menschen. <http://w210.ub.uni-tuebingen.de/dbt/volltexte/2004/1337/>
- ⁷ Robinson-Rechavi M., Escriva Garcia H., Laudet V. The nuclear receptor superfamily. *J. Cell. Sci.* 116 (2003, Feb 15) 585-586
- ⁸ Makishima M., Okamoto A. Y., Repa J. J., Tu H., Learned R. M., Luk A., Hull M. V., Lustig K. D., Mangelsdorf D. J., Shan B. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284 (1999) 1362-1365
- ⁹ Parks D. J., Blanchard S. G., Bledsoe R. K., Chandra G., Consler T. G., Kliewer S. A., Stimmel J. B., Willson T. M., Zavacki A. M., Moore D. D., Lehmann J. M. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 284 (1999) 1365-1368
- ¹⁰ Wang H., Chen J., Hollister K., Sowers L. C., Forman B. M.. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol. Cell* 3, (1999) 543-553
- ¹¹ Kliewer, S. A., Moore J. T., Wade L., Staudinger J. L., Watson M. A., Jones S. A., McKee D. D., Oliver B. B., Willson T. M., Zetterstrom R. H.,

- Perlmann T., Lehmann J. M. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell.* 92 (1998) 73-82
- ¹² Sonoda J., Xie W., Rosenfeld J. M., Barwick J. L., Guzelian P. S., Evans R. M. Regulation of a xenobiotic sulfonation cascade by nuclear pregnane X receptor (PXR). *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2002) 13801-13806
- ¹³ Ishibashi S., Schwartz M., Frykman P. K., Hertz J., Russell D. W. Disruption of cholesterol 7 α -hydroxylase gene in mice: I. Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 18017-18023
- ¹⁴ Pullinger C. R., Eng C., Salen G., Shefer S., Batta A. K., Erickson S. K. et al. Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J. Clin. Invest.* 110 (2002) 109-117
- ¹⁵ Goodwin B., Jones S. A., Price R. R., Watson M. A., McKee D. D., Moore L. B., Galardi C., Wilson J. G., Lewis M. C., Roth M. E., Maloney P. R., Willson T. M., Kliewer S. A. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol. Cell* 6, (2000) 517-526
- ¹⁶ Lu T. T., Makishima M., Repa J. J., Schoonjans K., Kerr T. A., Auwerx J., Mangelsdorf D. J. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol. Cell* 6 (2000) 507-515
- ¹⁷ Einarrson K., Gustafsson J. A. Effects of a potent catatotoxic steroid, 16-cyanopregnенolone, on microsomal metabolism of steroid hormones, sterols and bile acids in rats. *Eur. J. Biochem.* 32 (1973) 197-206
- ¹⁸ Staudinger J. L., Goodwin B., Jones S. A., Hawkins-Brown D., McKenzie K. I., LaTour A. A., Liu Y., Klaasen C. D., Brown K. K., Reinhard J., Willson T. M., Koller B. H., Kliewer S. H. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 3369-3374

- ¹⁹ Chiang J. Y. L., Stroup D. Identification and characterization of a putative bile acid response element in cholesterol 7 α -hydroxylase gene promotor. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 17502-17507
- ²⁰ Stroup D., Crestiani M., Chiang J. Y. L.. Identification of a bile acid response element in the 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1). *Am. J. Physiol.* 273 (1997) G508-G517
- ²¹ Ananthanarayanan M., Balasubramanian N. V., Makishima M., Mangelsdorf D. J., Suchy F. J. Human bile salt export pump (BSEP) promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor (FXR/BAR). *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 28857-28865
- ²² Kast H. R., Goodwin B., Tarr P. T., Jones S. A., Anisfield A. M., Stoltz C. M. et al. Regulation of Multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane x receptor, farnesoid x-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 2908-2915
- ²³ Choi M., Moschetta A., Bookout A. L., Peng L., Umetani M., Holmstrom S. R., Suino-Powell K., Xu H. E., Richardson J. A., Gerard R. D., Mangelsdorf D. J., Kliewer S. A. Identification of a hormonal basis for gallbladder filling. *Nat. Med.* 12 (2006) 1253-1255
- ²⁴ Grober J. Zaghini I., Fujii H., Jones S. A., Kliewer S. A., Willson T. M. et al. Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene. Involvement of the farnesoid x receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 29749-29754
- ²⁵ Renz H. (Hrsg.) *Integrative Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin*. Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York (2003) 415-423
- ²⁶ Wong M. H., Oelkers P., Craddock A. L., Dawson P. A. Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile-acid transporter. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 1340-1347
- ²⁷ Denson L. A., Sturm E., Echevarria W., Zimmerman T. L., Makishima M., Mangelsdorf D. J. et al. The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid

induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology* 121 (2001) 140-147

²⁸ Zamek-Gliszczynski M. J., Nezasa K., Tian X., Bridges A. S., Lee K., Belinsky M. G., Kruh G. D., Brouwer K. L. R.. Evaluation of the Role of Multidrug Resistance-Associated Protein (Mrp) 3 and Mrp4 in Hepatic Basolateral Excretion of Sulfate and Glucuronide Metabolites of Acetaminophen, 4-Methylumbelliflone, and Harmol in *Abcc3*/ and *Abcc4*/ Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319(3) (2006) 1485-1491

²⁹ Maher J. M., Cheng X., Slitt A. L., Dieter M. Z., Klaassen C. D. Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver. *Drug Metab. Dispos.* 33 (7) (2005) 956-962

³⁰ Inagaki T., Moschetta A., Lee Y. K., Peng L., Zhao G., Downes M., Yu R. T., Shelton J. M., Richardson J. A., Repa J. J., Mangelsdorf D. J., Kliewer S. A. Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 3920-3925

³¹ Langmann T., Möhle C., Maurer R.. Scharl M., Liebisch G., Zahn A., Stremmel W., Schmitz G. Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: Dysregulation of pregnane X receptor (PXR) target genes. *Gastroenterology* 127 (2004) 339-340

³² Shah Y. M., Ma X., Morimura K., Kim I., Gonzalez F. J. Pregnan X receptor activation ameliorates DSS-induced inflammatory bowel disease via inhibition of NF-kappaB target gene expression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292 (2007) G1114-G1122

³³ Zhou C., Tabb M. M., Nelson E. L., Grun F., Verma S., Sadatrafie A., Lin M., Mallick S., Forman B. M., Thummel K. E., Blumberg B. Mutual repression between steroid and xenobiotic receptor and NF-kappaB signaling pathways links xenobiotic metabolism and inflammation. *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 2280-2289

- ³⁴ Dring M. M., Goulding C.A., Trimble V. I., Keegan D., Ryan A. W., Brophy K. M., Smyth C. M., Keeling P. W., O'Donoghue D., O'Sullivan M., O'Morain C., Mahmud N., Wikstrom A. C., Kelleher D., McManus R. The pregnane X receptor locus is associated with susceptibility to inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 130 (2006) 341-348; quiz 592
- ³⁵ Langmann T., Schmitz G. Loss of detoxification in inflammatory bowel disease. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 3 (2006) 358-359
- ³⁶ Holt J. A., Luo G., Billin A. N., Bisi J., McNeill Y. Y., Kozarsky K. F., Donahee M., Wang D. Y., Mansfield T. A., Kliewer S. A., Goodwin B., Jones S. A. Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev.* 12 (2003) 1581-1591
- ³⁷ Li J., Pircher P. C., Schulman I. G., Westin S. K. Regulation of complement C3 expression by the bile acid receptor FXR. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 7427- 7434
- ³⁸ Inagaki T., Choi M., Moschetta A., Peng L., Cummins C. L., McDonald J. G., Luo G., Jones S. A., Goodwin B., Richardson J. A., Gerard R. D., Repa J. J., Mangelsdorf D. J., Kliewer S. A. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* 2 (4) (2005) 217-225
- ³⁹ Quiagen RNeasy Mini Kit Handbuch. Ausgabe April 2002.
- ⁴⁰ Technical Bulletin (revised 6/06). Reverse transcription system. Promega Corporation, Madison, USA
- ⁴¹ Bustin S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25 (2000) 169-193
- ⁴² Pfaffl M. W. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 10 (2004) 92-95
- ⁴³ Lehmann J. M., McKee D. D., Watson M. A., Willson T. M., Moore J. T., Kliewer S. A. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by

compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J. Clin. Invest.* 102 (1998) 1016-1023

⁴⁴ Technical bulletin (revised 6/06). Luciferase assay system, Promega Corporation, Madison, USA

⁴⁵ Suzuki Y., Yamashita R., Nakai K., Sugano S. DBTSS: DataBase of human Transcriptional Start Sites and full-length cDNAs. *Nucleic Acids Res* 30 (2002) 328-331

⁴⁶ Podvinec M., Kaufmann M. R., Handschin C., Meyer U. A., NUBIScan, an in silico approach for prediction of nuclear receptor response elements. *Mol. Endocrinol.* 16, (2002) 1269-1279

⁴⁷ Yu J., Lo J. L., Huang L., Zhao A., Metzger E., Adams A., Meinke P. T., Wright S. D., Cui J. Lithocholic acid decreases expression of bile salt export pump through farnesoid X receptor antagonist activity. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 31441-31447

⁴⁸ Goodwin B., Hodgson E., Liddle C. The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. *Mol. Pharmacol.* 56, (1999) 1329-1339

⁴⁹ Kliewer S. A., Goodwin B., Willson T. M. The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev* 23 (2002) 687-702

⁵⁰ Krasowski M. D., Yasuda K., Hagey L. R., Schuetz E. G. Evolution of the pregnane x receptor: adaptation to cross-species differences in biliary bile salts. *Mol. Endocrinol.* 19 (2005) 1720-1739

⁵¹ Steven A. Kliewer, Bryan Goodwin and Timothy M. Willson. The nuclear pregnane x receptor: A key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr. Rev.* 23 (5) (Oct 2002) 687-702

⁵² Tomlinson E., Fu L., John L., Hultgren B., Huang X., Renz M., Stephan J. P., Tsai S. P. Powell-Braxton L., French D., Stewart T. A. Transgenic Mice Expressing Human Fibroblast Growth Factor-19 Display Increased Metabolic Rate and Decreased Adiposity. *Endocrinology* 143 (2002) 1741-1747

⁵³ Fu L., John L. M., Adams S. H., Yu X. X., Tomlinson E., Renz M., Williams P. M., Soriano R., Corpuz R., Moffat B., Vandlen R., Simmons L., Foster J., Stephan J. P., Tsai S. P. Stewart T. A. Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes. *Endocrinology* 145 (2004) 2594-2603

⁵⁴ Nicholes K., Guillet S., Tomlinson E., Hillan K., Wright B., Frantz G. D., Pham T. A., Dillard-Telm L., Tsai S. P., Stephan J. P., Stinson J., Stewart T., French D. M. A mouse model of hepatocellular carcinoma: Ectopic expression of fibroblast growth factor 19 in skeletal muscle of transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 160 (2002) 2295-2307