

Unmittelbare, dauerhafte sowie evolutionäre Anpassung an Fremdstoffexpositionen

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Marianne Mathäs

Mainz, den 21.1.2014

Dekan:

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 5. März 2014

Ich versichere, dass ich meine Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Mainz, den 21. Januar 2014

Marianne Matkäs

Inhaltsverzeichnis

Bilderverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vi
Zusammenfassung	viii
Abstract (English)	x
1 Einleitung	1
1.1 Fremdstoffmetabolismus	1
1.2 CAR und PXR als Xenosensoren	1
1.2.1 Aktivierung	2
1.2.2 Molekularstruktur	5
1.3 Klinisch relevante Arzneimittelinteraktionen	8
1.4 Endogene Funktionen von CAR und PXR sowie pathophysiologische Konsequenzen ihrer chronischen Aktivierung	10
1.5 Dauerhafte Veränderungen des Fremdstoffmetabolismus nach transienter Fremdstoffexposition	12
1.6 Multi- und transgenerationale Effekte	13
1.7 Evolution von PXR und CAR / Variabilität im Fremdstoffmetabolismus der Arten	14
1.8 Ziele der Arbeit	16
2 Material und Methoden	18
2.1 Molekularbiologische Methoden	18
2.1.1 RNA-Extraktion	18
2.1.2 RNA Qualitätskontrolle und Hochdurchsatz-Sequenzierung	18
2.1.3 Bioinformatische Datenanalyse der Hochdurchsatz-RNA-Sequenzierung	19
2.1.3.1 Qualitätskontrolle	19
2.1.3.2 Entfernen von Sequenzabschnitten	19
2.1.3.3 Alignieren der Sequenzen am Genom	19
2.1.3.4 Erstellen eines Genexpressionsprofils	20
2.1.3.5 Analyse der differentiellen Expression	20
2.1.3.6 Gruppierung der differentiell exprimierten Gene und Signalweg-Analyse	20
2.1.4 Chip Microarray	20
2.1.5 Reverse Transkription für quantitative PCR	21

2.1.6	Quantitative PCR.....	21
2.1.7	Klonierung des Constitutiven Androstane Receptors (CAR) von Amphibien und Reptilien.....	22
2.1.8	Klonierung von CAR-GFP Fusionsproteinen.....	23
2.1.9	Klonierung von <i>Xenopus tropicalis</i> Cytochrom-P450 Reportergerkonstrukten ..	24
2.1.10	Mutagenese	24
2.1.11	In vitro Proteinexpression und Quantifizierung mittels Western Blot	26
2.1.12	Analyse der intrinsischen Unordnung	27
2.1.13	Durchflusszytometrie	27
2.1.14	Kultivierung von immortalisierten Zelllinien	28
2.1.15	Transfektion	28
2.1.16	Protein Interaktionen mit dem <i>mammalian-two-hybrid</i> -System.....	29
2.1.17	Reportergermessung	30
2.1.18	Laser-Scanning-Mikroskop (LSM).....	30
2.2	Tierversuche.....	31
2.2.1	Induktion von <i>Xenopus laevis</i>	31
2.2.2	Mauszucht	31
2.2.3	Geschlechtsbestimmung an neugeborenen Mäusen mittels multiplex-PCR	32
2.2.4	DNA-Isolierung aus Mäuseschwänzen	32
2.2.5	Induktion von Mäusen.....	33
2.3	Statistische Analyse.....	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Generationsübergreifende Induktion <i>in vivo</i>	34
3.1.1	Langzeitinduktion in Mäusen nach einmaliger Induktion.....	34
3.1.2	Multigenerationale Vererbung der Enzyminduktion.....	37
3.1.3	Transgenerationale Vererbung der Enzyminduktion	39
3.1.4	Generationsübergreifende Enzyminduktion nach Injektion von Adulttieren.....	41
3.1.5	Der genomweite Umfang der dauerhaften sowie generationsübergreifenden Veränderungen nach einmaligem Fremdstoffkontakt in der F ₀ -Generation.....	43
3.2	Evolutionäre Anpassung.....	49
3.2.1	Klonierung und Expression von CAR von Nichtsäugetierarten	49
3.2.2	Expression der Nichtsäugetier-CAR-Gene.....	51
3.2.3	Determinanten der niedrigen basalen Aktivität von CAR bei Amphibien.....	53
3.2.4	Ligandenspektrum von <i>Xenopus laevis</i> CAR	55
3.2.5	Funktionelle Untersuchungen zur Helix 11'	57
3.2.6	Strukturunterschiede des humanen und <i>Xenopus</i> -CAR	58
3.2.6.1	Proteinfaltung zwischen Helix 1 und Helix 3	58
3.2.6.2	Funktion des interhelikalen Bereichs zwischen Helix 1 und Helix 3	59

3.2.6.3	Zuordnung der Proteinfunktion zu einzelnen Proteinstrukturen: Humanisierung einzelner Aminosäuren des xICARa.....	60
3.2.6.4	Mutationen positiv selektionierter Aminosäuren.....	62
3.2.6.5	Mutationen zur Unterstützung des Proteinmodells von xICARa.....	65
3.2.7	Hepatische und renale Zielgene von <i>Xenopus laevis</i> CAR.....	70
4	Diskussion	74
4.1	Generationsübergreifende Genexpressionsveränderungen nach einmaligem Fremdstoffkontakt.....	74
4.1.1	CAR-vermittelte maternale Vererbung der Kapazität des Fremdstoffmetabolismus.....	74
4.1.2	PXR-vermittelter generationsübergreifender Einfluss auf die Genexpression	77
4.1.3	Klinische Relevanz	78
4.2	CAR des <i>Xenopus laevis</i> ist strukturell und funktionell analog zum humanen PXR.....	80
4.2.1	Proteinstruktur	81
4.2.2	Determinanten der basalen Aktivität	82
4.2.3	<i>Xenopus laevis</i> -CAR als Xenosensor.....	83
4.2.4	Positiv selektionierte Aminosäuren	86
4.2.5	Zielgene von xICARa	87
4.3	Anpassung von Lebewesen an ihre Umwelt	88
5	Anhang.....	99
	Abkürzungsverzeichnis	99
	Dank.....	113

Bilderverzeichnis

Bild 1.1:	Struktur und DNA-Bindung von CAR und PXR (Handschin and Meyer, 2003).....	6
Bild 1.2:	Arzneistoff-metabolisierende Enzyme (Evans and Relling, 1999).....	8
Bild 1.3:	Konsequenzen eines veränderten Arzneistoffmetabolismus (eigene Darstellung)	9
Bild 1.4:	Evolution der NR1I-Genfamilie (Mathäs et al., 2012).....	16
Bild 2.1:	Schematische Darstellung eines Reporter-genversuches (nach King-Jones and Thummel, 2005)	28
Bild 2.2:	Schematische Darstellung des <i>Mammalian-two-hybrid</i> -Versuchssystems (nach King-Jones and Thummel, 2005)	29
Bild 3.1:	Hepatische Genexpression von Cyp-Enzymen im Verlauf von 3 Monaten nach einer Einzelgabe von TCPOBOP oder PCN.....	37
Bild 3.2:	Hepatische Genexpression von Cyp-Enzymen in der F ₁ -Generation im Verlauf von 3 Monaten nach einer Einzelgabe von TCPOBOP oder PCN in der F ₀ -Generation	39
Bild 3.3:	Hepatische Genexpression von Cyp2b10 in der F ₂ -Generation im Verlauf von 3 Monaten nach einer Einzelgabe von TCPOBOP in der F ₀ -Generation.....	41
Bild 3.4:	Langzeitinduktion sowie multigenerationaler Transfer der Cyp2b10-Expression nach Injektion von weiblichen Adulttieren	42
Bild 3.5:	Anzahl der direkt, langfristig und generationsübergreifend differentiell exprimierten Gene nach TCPOBOP bzw. PCN Induktion.....	44
Bild 3.6:	Heatmap der differentiell exprimierten Gene bei F ₀ - sowie F ₁ -Tieren nach einmaliger TCPOBOP- oder PCN-Injektion in der F ₀ -Generation.....	46
Bild 3.7:	Analyse der differentiell exprimierten Gene mit einer Rolle im Fremdstoffmetabolismus oder Energiemetabolismus	47
Bild 3.8:	Analyse der differentiell regulierten Signalwege.....	48
Bild 3.9:	Struktur sowie Aminosäuresequenzvergleich von humanem PXR und CAR mit Nichtsäugetier-CAR.....	50
Bild 3.10:	Expressionsstärke von hsCAR im Vergleich zu xlCAR in COS7-Zellen.....	52
Bild 3.11:	Basale Aktivität und Induzierbarkeit der Sauropsida sowie Amphibien-CAR erstellt nach Daten von C. Nußhag und U. Goedel-Armbrust.....	53
Bild 3.12:	Zelluläre CAR Verteilung nach transients Transfektion in LS174T-Zellen ...	54
Bild 3.13:	EC ₅₀ -Werte für xlCARa-Liganden.....	56
Bild 3.14:	Funktionelle Charakterisierung der H11' des <i>Xenopus</i> - sowie des humanen CAR.....	58

Bild 3.15:	Intrinsische Unordnung der interhelikalen Sequenz C-terminal der Helix 3 von humanem CAR sowie PXR im Vergleich zu Nichtsäugetier CAR.....	59
Bild 3.16:	Die Rolle des interhelikalen Bereichs C-terminal der Helix 3 für die Funktion des hsPXR	60
Bild 3.17:	Basale sowie ligandenabhängige Aktivität von 13 xlCARa Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.....	61
Bild 3.18:	Basale sowie ligandenabhängige Aktivität von hsCAR Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.....	61
Bild 3.19:	Stammbaum der NR1I-Familie – Scenario 1	62
Bild 3.20:	Stammbaum der NR1I-Familie – Scenario 2	64
Bild 3.21:	Basale und ligandenabhängige Heterodimerisierung von xlCARa sowie xlCARa-Mutanten mit RXRa.....	67
Bild 3.22:	Basale und ligandenabhängige Interaktion von xlCARa sowie xlCARa-Mutanten mit dem Koaktivator SRC-1	68
Bild 3.23:	Basale und ligandenabhängige Interaktion von xlCARa sowie xlCARa-Mutanten mit dem Koaktivator PGC-1a	69
Bild 3.24:	Cyp3a-Aktivität bei <i>Xenopus</i> in LS174T-Zellen.....	70
Bild 4.1:	IUCN Red List Index für Riffkorallen, Vögel, Säugetiere sowie Amphibien.	80
Bild 5.1:	Anzahl der gemeinsamen Zielgene von CAR und PXR.....	105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Primer für quantitative PCR.....	21
Tabelle 2.2:	Reaktionsansatz quantitative PCR.....	22
Tabelle 2.3:	Primer für die Klonierung der konstitutiven Androstane Rezeptoren von <i>Xenopus laevis</i> , <i>Xenopus tropicalis</i> sowie <i>Anolis carolinensis</i>	23
Tabelle 2.4:	Primer für die Klonierung von CAR-GFP Fusionsproteinen.....	23
Tabelle 2.5:	Primer für die Klonierung der Cyp-Reportergenkonstrukte von <i>Xenopus tropicalis</i>	24
Tabelle 2.6:	Primer für die Mutagenese	25
Tabelle 2.7:	Reagenzien für die Kultivierung von LS174T-Zellen sowie COS7-Zellen.....	28
Tabelle 2.8:	Transfektionsansatz	29
Tabelle 2.9:	Induktoren mit Konzentrationen.....	29
Tabelle 2.10:	Primer zur Geschlechtsbestimmung bei Mäusen	32
Tabelle 2.11:	STE-Puffer	33
Tabelle 3.1:	FPKM-Werte sowie Genexpressionsänderungen von Cyp2b10 in F ₀ - und F ₁ -Männchen.....	45
Tabelle 3.2:	Accessionnummern der cDNA-CAR-Sequenzen von <i>Anolis carolinensis</i> , <i>Xenopus tropicalis</i> sowie <i>Xenopus laevis</i>	49
Tabelle 3.3:	Vergleich der eingesetzten Ligandenkonzentrationen mit den ermittelten EC ₅₀ -Werten.....	56
Tabelle 3.4:	Ast-Codon-Analyse des <i>Xenopus</i> CAR-Astes	64
Tabelle 3.5:	Ast-Codon-Analyse des basalen CAR-Astes	64
Tabelle 3.6:	Genexpressionsunterschiede in der Leber von <i>Xenopus laevis</i> Weibchen, welche mit Artemisinin oder Pregnenolon behandelt wurden*.....	71
Tabelle 3.7:	Genexpressionsunterschiede in der Niere von <i>Xenopus laevis</i> Weibchen, welche mit Artemisinin oder Pregnenolon behandelt wurden*.....	72
Tabelle 5.1:	Splice-Varianten des humanen CAR	101
Tabelle 5.2:	Genexpressionsänderungen von Cyp2b10*	102
Tabelle 5.3:	Anzahl der Versuche, SD sowie SEM für xICARa Mutationen	103
Tabelle 5.4:	Anzahl der Versuche, SD sowie SEM für hsCAR Mutationen.....	103
Tabelle 5.5:	alphabetische Top 15-Liste der direkt, langfristig und generationsübergreifend differentiell exprimierten Gene nach TCPOBOP bzw. PCN Induktion	104
Tabelle 5.6:	Anzahl der Reads sowie detektierte Gene bei der Hochdurchsatz-RNA-Sequenzierung.....	105

Tabelle 5.7: Tierzahlen pro Versuchsgruppe mit Standardabweichung für injizierte Neugeborene	106
Tabelle 5.8: Tierzahlen pro Versuchsgruppe mit Standardabweichung für injizierte Adulttiere	107

Zusammenfassung

Eine der Hauptursachen für unerwünschte oder reduzierte Wirkungen von Medikamenten ist die Induktion von Enzymen und Transportern des Medikamentenstoffwechsels. Diese Induktion stellt ursprünglich eine physiologische Reaktion auf die Aufnahme von potentiell schädlichen Fremdstoffen aus der Umwelt dar und sichert so die Gesundheit und Fortpflanzungsfähigkeit von Lebewesen. Beim Menschen sowie anderen Säugetieren werden Fremdstoffe hauptsächlich von den nukleären Rezeptoren PXR und CAR in der Leber und im Dünndarm detektiert. Zu den Medikamenten, welche über PXR und CAR wirken, gehören unter anderem Antikonvulsiva, Statine, antiretrovirale Medikamente, Glucocorticoide sowie Antimykotika. Die durch Fremdstoffe aktivierten Transkriptionsfaktoren PXR und CAR steigern die Menge der Enzyme und Transporter des Fremdstoffmetabolismus. Hierzu zählen vor allem die Cytochrom P450-Enzyme (Cyp-Enzyme) mit breitem Substratspektrum oder der Transporter MDR1, welcher eine Vielzahl von Substraten über Membranen transportiert. Durch die Biotransformation werden die induzierenden, lipophilen Substanzen so modifiziert, dass sie leichter über den Urin oder die Galle ausgeschieden werden können.

Die Dauer der Induktion sollte auf die Zeit der Fremdstoffexposition beschränkt sein, um Störungen des endogenen Stoffwechsels zu vermindern. In dieser Arbeit werden jedoch Hinweise auf dauerhafte und sogar generationsübergreifende Effekte von Medikamenten in Mäusen geliefert. Nachkommen von Müttern, welche bereits vor ihrer Verpaarung einmalig mit TCPOBOP, einem Liganden des murinen CAR, injiziert wurden, hatten eine ungefähr 100-fach gesteigerte Genexpression von Cyp2b10. Auch gab es Expressionsänderungen von Genen, deren Produkte eine Rolle im Lipidstoffwechsel sowie bei Immunkrankheiten spielen. Eine Hochdurchsatz-RNA-Sequenzierung der injizierten Elterngeneration ergab außerdem dauerhafte Expressionsveränderungen anderer Gene des Medikamentenstoffwechsels sowie von Genen mit Verbindung zum Energiemetabolismus.

Berücksichtigt man die enge evolutionäre Verwandtschaft der nukleären Rezeptoren CAR und PXR, sind Langzeitveränderungen auch für PXR möglich und wurden im Verlauf dieser Arbeit ebenfalls untersucht. Eine Hochdurchsatz-Sequenzierung ergab für Mäuse, welche mit dem PXR-Aktivator PCN induziert wurden, dass selbst noch drei Monate nach der Exposition Gene verändert exprimiert waren, welche im Zusammenhang mit Lebernekrosen stehen. Bei Nachkommen von PCN-injizierten Müttern wurden Gene unterschiedlich exprimiert, welche eine Rolle bei der Energiehomöostase sowie im Glukosestoffwechsel spielen. Im Erwachsenenalter sind bei diesen Nachkommen darüber

hinaus noch Gene unterschiedlich exprimiert, deren Produkte eine Funktion in der Immunantwort haben.

Da Erwachsene aufgrund ihrer Lebensdauer sowie der absoluten Krankheitshäufigkeit wesentlich öfter Kontakt mit Fremdstoffen haben, war medizinisch von besonderem Interesse, ob anhaltende Genexpressionsänderungen auch bei Erwachsenen zu beobachten sind. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch einmalig exponierte Adulttiere Gene dauerhaft verändert exprimieren und die Veränderungen im Medikamentenstoffwechsel an die nächste Generation übertragen.

Bisher sind klinische Studien zur Risikobewertung von Medikamenten (Pharmakovigilanz) nicht generationsübergreifend angelegt. Diese Arbeit gibt Anstöße dafür, dass dies in Zukunft für viel mehr Medikamente notwendig werden könnte. Neben Veränderungen im Medikamentenstoffwechsel ergeben sich Nebenwirkungen von PXR- und CAR-Liganden vor allem aus ihrer Beteiligung an endogenen Stoffwechselwegen. Nach Aktivierung von CAR, welcher viele metabolische Stoffwechselwege steuert, treten beispielsweise Störungen des Energiestoffwechsels auf. Ein tieferes Verständnis der Rezeptoraktivität von CAR samt einer gezielten Modulierung seiner Aktivität würde wichtige Beiträge zum Verständnis der Regulation des Fremdstoffmetabolismus sowie der Entstehung von Nebenwirkungen durch eine Behandlung mit CAR-Liganden leisten. Dauerhafte Veränderungen endogener Stoffwechselwege könnten dann möglicherweise über eine pharmakologische Modulierung der CAR-Aktivität reduziert werden.

Zu diesem Zweck wurden im Verlauf dieser Arbeit die CAR-Rezeptoren der Amphibien (*Xenopus tropicalis*, *Xenopus laevis*) und Reptilien (*Anolis carolinensis*) erstmals kloniert, als Proteine exprimiert und charakterisiert. Vergleiche zwischen Tierarten ermöglichen ein besseres Verständnis von humanen Proteinen. Funktionelle Analysen ergaben Ähnlichkeiten des *Xenopus laevis*-CAR mit dem PXR der Säugetiere: eine niedrige basale Aktivität sowie eine starke Induzierbarkeit durch Liganden. In weiteren funktionellen Analysen wurden die Determinanten der basalen Aktivität des *Xenopus laevis*-CAR untersucht. Die basale Aktivität war nicht abhängig von der subzellulären Lokalisation, sondern ergab sich aus der Proteinstruktur, welche nur beim CAR der Landvertebraten in einer aktiven Konformation fixiert ist. Ähnlich dem PXR der Säugetiere besitzt CAR der Amphibien eine Aktivierungsdomäne, welche erst durch Ligandenbindung in eine aktive Konformation gebracht wird. Mutationen einzelner Aminosäuren zum jeweils humanen Homolog erhöhten die basale Aktivität des *Xenopus laevis*-CAR auf die des humanen Rezeptors. Diese Mutanten mit erhöhter basalen Aktivität zeigten eine verstärkte Interaktion mit dem Kofaktor PGC-1 α , einem Regulator des Energiestoffwechsels bei Säugetieren. Die hepatischen Zielgene des CAR der Amphibien überlappen zum Teil mit den humanen Zielgenen und spielen ebenfalls eine Rolle im Energiestoffwechsel.

Abstract (English)

A major source of adverse drug reactions is the induction of drug-metabolizing enzymes and transporters. This induction originally constitutes a physiological response to potentially harmful xenobiotics and it is essential to health and reproduction. In humans and other mammals xenobiotics are detected chiefly by the nuclear receptors PXR and CAR expressed in the liver and small intestine. Drugs acting via PXR and CAR include anticonvulsants, statins, antiretrovirals, glucocorticoids as well as antimycotics. The xenobiotic-activated transcription factors PXR and CAR induce the expression of xenobiotic-metabolizing enzymes and transporters. Most notable examples are the broad-spectrum cytochrome P450-enzymes (Cyp-enzymes) or the transporter MDR1, which transports various substrates across membranes. Enzymatic biotransformation increases the solubility of xenobiotics, facilitating their excretion with the urine or bile.

The induction is assumed to be contingent upon the presence of an inducer to reduce disturbances of endogenous pathways. In contrast, this work indicates that inducing drug effects can be transmitted across generations. Offspring of female F₀-mice injected as newborns with TCPOBOP, a murine CAR ligand, showed an approximately 100-fold gene-induction of Cyp2b10. There were also altered expressions of genes with products involved in the lipid metabolism and immunological diseases. High throughput sequencing of the injected parental generation revealed additionally long-term expression changes of other genes related to drug metabolism and energy metabolism. Considering the close evolutionary relationship between the nuclear receptors CAR and PXR, the existence of long-term changes triggered by PXR-activation was also likely and was investigated alongside. High throughput sequencing of mice induced with the PXR-activator PCN revealed expression changes implicated in liver necrosis 3 month after exposition. In offspring of PCN-injected females gene-expression changes related to energy homeostasis as well as the glucose metabolism were observed. Adult offspring displayed differential expression of genes with products involved in the immune response.

Adults are exposed to xenobiotics more often due to the age-driven increase in the disease prevalence. Therefore it was of particular medical interest if long-term gene expression changes could be observed in adults, too. This work demonstrates that transiently induced adult animals also show long-term modified gene expression levels and that they transmit an altered drug metabolism to the next generation.

So far clinical trials for the risk-assessment of drugs (pharmacovigilance) are not designed to detect such multigenerational effects. This work suggests that such effects will have to be considered in future drug trails. In addition to changes in drug metabolism, adverse drug

effects of CAR- and PXR-ligands may result from their involvement in endogenous metabolic pathways. For instance, activation of CAR, which regulates numerous metabolic pathways, results in disturbances of energy metabolism. A deeper understanding of the CAR-receptor activity would significantly contribute to the knowledge of the regulation of the drug metabolism as well as the origin of adverse side effects in therapies with CAR-ligands. In the future, long-term changes of endogenous metabolic pathways could be reduced by pharmacologic modulation of CAR-activity.

To draw comparisons between species will allow a better knowledge of human proteins. For this purpose, CAR-receptors of amphibians (*Xenopus tropicalis*, *Xenopus laevis*) and reptiles (*Anolis carolinensis*) were cloned for the first time, expressed as proteins and characterized. Comparisons between species allow for a better understanding of human proteins. Functional analysis revealed similarities of *Xenopus laevis*-CAR with mammalian PXR: a low basal activity as well as a pronounced inducibility by ligands. The determinants of the *Xenopus laevis*-CAR basal activity were investigated in functional assays. The basal activity was independent from the subcellular localization of the receptor, but related to its protein structure, which, in contrast to land vertebrates, is fixed in an inactive conformation. Similar to mammalian PXR, the activation domain of the amphibian CAR is brought into an active conformation only upon ligand binding. Mutation of single amino acids to the corresponding human homolog elevated the basal activity of *Xenopus laevis*-CAR to the level of the human receptors. The mutants with increased basal activity showed enhanced interaction with the cofactor PGC-1 α , a regulator of the energy metabolism in mammals. The hepatic target genes of amphibian CAR partly overlap with human target genes and play a role in energy metabolism, too.

1 Einleitung

1.1 Fremdstoffmetabolismus

Menschen und Tiere sind täglich einer Reihe von Fremdstoffen ausgesetzt, welche sie mit der Nahrung oder durch ihre Umwelt aufnehmen. Dies können natürliche Nahrungsbestandteile oder Umweltgifte und Medikamente anthropogenen Ursprungs sein. Ein effizienter Stoffwechsel und anschließende Ausscheidung verhindert eine Akkumulation von Fremdstoffen im Körper und sichert so Gesundheit und Fortpflanzungsfähigkeit. Viele dieser Substanzen sind lipophil und werden im Verdauungstrakt von Menschen gut resorbiert. Die Ausscheidung solcher Stoffe aus dem Körper wird von Transportsystemen der Leber sowie des Dünndarms übernommen und durch Modifikationen der Substanzen ermöglicht, welche ihre Lösbarkeit erhöhen. Genauso werden auch lipophile endogene Stoffe wie Steroidhormone oder Gallensäuren ausgeschieden. Die Expression der daran beteiligten Enzyme wird an die Art und Menge der Fremdstoffe angepasst. Diese Mengenanpassung durch Induktion wird von nukleären Rezeptoren gesteuert, welche durch die Substanzen aktiviert werden; in Folge dessen induzieren viele dieser Stoffe ihren eigenen Abbau. Die wichtigsten dieser Xenosensoren sind die nukleären Rezeptoren der NR1I Familie: Pregnene-X-Receptor (PXR) und der Constitutive-Androstane-Receptor (CAR).

1.2 CAR und PXR als Xenosensoren

Nukleäre Rezeptoren sind substanzabhängige Transkriptionsfaktoren. Sie binden eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher, endogener sowie exogener Substanzen (di Masi *et al.*, 2009). CAR und PXR sind durch Genomduplikation vor der Abspaltung der Fische von den Landwirbeltieren aus einem gemeinsamen Vorläufergen entstanden (Mathäs *et al.*, 2012). Zusammen mit dem Vitamin D-Rezeptor (VDR) bilden sie die NR1I-Familie der nukleären Rezeptoren. CAR und PXR binden teilweise die gleichen Substanzen und regulieren als Transkriptionsfaktoren ein überlappendes Spektrum an Genen (Tojima *et al.*, 2012). Die Affinität zu den Liganden sowie die Zielgene der nukleären Rezeptoren sind häufig artspezifisch (Iyer *et al.*, 2006; Timsit and Negishi, 2007).

Zielgene von CAR sowie PXR codieren für Phase I und II Enzyme des Fremdstoffmetabolismus, sowie für Transporter, die üblicherweise als Phase III bezeichnet

werden. Die Hauptfunktion der Enzyme ist die Biotransformation von lipophilen Stoffen in der Leber und im Dünndarm. Durch molekulare Veränderungen wie Oxidation der unpolaren Substanzen in der Phase I und Konjugationen in der Phase II wird deren Wasserlöslichkeit erhöht und die renale oder biliäre Ausscheidung ermöglicht. Beispiele hierfür sind die Cytochrom P450-Enzyme der Phase I. Die Expression der beteiligten Enzyme und Transporter kann durch die nukleären Rezeptoren induziert werden (Handschin and Meyer, 2003). Gemeinsame Zielgene von CAR und PXR sind CYP2B6, CYP3A4 sowie CYP2C9. Zu den pharmakologisch wichtigsten Zielgenen, welche für Phase II-Enzyme kodieren, gehören GSTA1 sowie UGT1As. Durch CAR und PXR regulierte Transporter der Phase III sind zum Beispiel MDR1 sowie MRP3 (Köhle and Bock, 2009).

Eine genomweite Analyse der Zielgene der murinen nukleären Rezeptoren PXR und CAR wurde von Tojima et al. veröffentlicht (Tojima *et al.*, 2012). Zu den gemeinsamen CAR- und PXR-Zielgenen der Maus gehören Cyp2b10, Cyp2c37 sowie Cyp3a11. Die Expression von Cyp2b10 konnte durch den murinen CAR-spezifischen Liganden TCPOBOP 150-fach gesteigert werden. Der PXR-spezifische Ligand PCN steigerte die Cyp2b10-Expression im Vergleich dazu nur 4-fach. Ähnlich sahen die Expressionsveränderungen von Cyp2c37 aus. Für Cyp3a11 wurde eine vergleichbare ungefähr 5-fache Genexpressionsänderung durch Induktion mit den beiden Liganden gezeigt. Gene deren Expression ausschließlich von einem der beiden Rezeptoren beeinflusst wird, sind im Allgemeinen nach Induktion wesentlich weniger stark in ihrer Expression verändert (Tojima *et al.*, 2012). Die größte Expressionsänderung eines ausschließlich durch CAR regulierten Gens zeigte *Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta* (Gadd45b) mit einer 14-fach induzierten Genexpression nach TCPOBOP-Exposition. Das ausschließlich durch PXR regulierte Gen *Acetoacetyl-CoA Synthase* (Aacs) war mit einer 2,6-fach gesteigerten Expression das am stärksten regulierte Gen dieser Gruppe.

1.2.1 Aktivierung

CAR

CAR befindet sich im Zytoplasma, gebunden an einen Proteinkomplex aus dem CAR *cytoplasmic retention protein* (CCRP) und dem Hitzeschock-Chaperon Hsp90 (Yoshinari *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2003). Durch diese Retention im Zytoplasma wird die dauerhafte Aktivierung der Zielgene des basal-aktiven Rezeptors verhindert (di Masi *et al.*, 2009). Die Translokation in den Zellkern bildet so den ersten Aktivierungsschritt des nukleären Rezeptors. Die Aufklärung dieser Translokation erwies sich in der

Vergangenheit als schwierig, da CAR sich spontan im Zellkern von transfizierten Zellen anreichert (Kawamoto *et al.*, 1999). Der Proteinkomplex im Zytoplasma wird nach Bindung von Liganden an CAR aufgelöst. Die substanzvermittelte Rekrutierung der Protein-Phosphatase 2A (PP2A) und anschließende Dephosphorylierung von CAR an der Aminosäure Ser202 ermöglichen die Translokation von CAR in den Zellkern (Yoshinari *et al.*, 2003; Hosseinpour *et al.*, 2006). Eine unter den nukleären Rezeptoren einzigartige Eigenschaft ist die Aktivierung von CAR durch Substanzen, welche nicht direkt an den Rezeptor binden wie zum Beispiel Phenobarbital (Kawamoto *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2000) und Bilirubin (Huang *et al.*, 2003). Die substanzabhängige Translokation von CAR wird durch ein leucinreiches Peptid (L/MXXLXXL) in der Helix 10 des CAR-Proteins vermittelt (Zelko *et al.*, 2001).

Zu den Liganden des humanen CAR gehören zum Beispiel die Antikonvulsiva Carbamazepin (Faucette *et al.*, 2007) und Phenytoin (Wang *et al.*, 2004), Statine wie Simvastatin und Pravastatin (Marino *et al.*, 2011), Artemether zur Therapie von Malaria (Burk *et al.*, 2012) oder Nevirapin zur AIDS-Behandlung (Faucette *et al.*, 2007). Anthropogene Umweltgifte wie Weichmacher und deren Zusatzstoffe zum Beispiel Diethylhexylphthalat (DEHP) (DeKeyser *et al.*, 2009) und Bisphenol A (BPA) (DeKeyser *et al.*, 2011) gehören genauso zu den CAR-Liganden wie das Pestizid Methoxychlor (Blizard *et al.*, 2001) und Bestandteile von DDT (Kublbeck *et al.*, 2011). Zu den endogenen Liganden gehören unter anderem Steroide wie 5b-Pregnane-3,20-dione (Moore *et al.*, 2000) und Androstanol (Forman *et al.*, 1998). Der am besten charakterisierte sowie spezifischste Ligand des humanen CAR ist CITCO (6-(4-Chlorophenyl)imidazol[2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehyde O-(3,4-dichlorobenzyl)oxime) (Maglich *et al.*, 2003).

In immortalisierten Zelllinien zeigt keiner der beschriebenen CAR-Liganden eine mehr als zweifache Induktion der Zielgene (Mathäs *et al.*, 2012). CAR liegt bereits im Zellkern vor und die hohe basale Aktivität wird nur noch schwach gesteigert (Maglich *et al.*, 2003). In primären Hepatozyten werden dagegen bis zu 30-fache Genexpressionsänderungen von CYP2B6 gemessen (Maglich *et al.*, 2003), in humanisierten Mäusen eine ungefähr 100-fache (Scheer *et al.*, 2008). CITCO ist kein Ligand des murinen CAR. Der spezifischste und am besten charakterisierte Ligand des murinen CAR ist TCPOBOP (siehe 1.2).

Im Zellkern bindet CAR als Heterodimer mit RXR (Retinoid-X-Receptor) an regulatorische Elemente im Promotorbereich seiner Zielgene. Durch die Rekrutierung der Kofaktoren SRC-1 (Forman *et al.*, 1998), PGC-1a (Miao *et al.*, 2006), GRIP1/TIF2 (Min *et al.*, 2002), Sp1 (Muangmoonchai *et al.*, 2001) sowie ASC-2 (Choi *et al.*, 2005) und SMC1 (Inoue *et al.*, 2006) an den Transkriptionsfaktorkomplex wird letztendlich die Genexpression der CAR-Zielgene gesteuert. Diese Koaktivatoren rekrutieren

Histonacetyltransferasen (Spencer *et al.*, 1997) sowie Methyltransferasen (Schurter *et al.*, 2001), wodurch die Chromatinstruktur im Promotorbereich der Zielgene aufgelockert wird und die Genexpression durch Bindung des basalen RNA-Polymerase-II-Transkriptionskomplexes erfolgen kann.

PXR

Die Grundzüge der PXR-Aktivierung sind ähnlich wie die des CAR. Wie CAR bildet auch PXR einen Proteinkomplex mit CCRP und HSP90 im Zytoplasma (Squires *et al.*, 2004). Die Rolle von Liganden für die Translokation von PXR in den Zellkern ist weniger gut verstanden als bei CAR (Timsit and Negishi, 2007). Nach Ligandenbindung dissoziiert PXR von diesem Proteinkomplex und transloziert genau wie CAR in den Zellkern. Hierfür sind drei funktionelle Bereiche des PXR-Proteins essentiell: Die *nuclear localization sequence* (NLS), welche sich am C-terminalen Ende der DNA-Bindedomäne befindet, die *xenobiotic response sequence* (XRS) sowie die AF-2-Domäne (Squires *et al.*, 2004). PXR besitzt eine niedrige basale Aktivität und ist, selbst wenn er nach Transfektion von Zellen direkt im Zellkern vorliegt (Squires *et al.*, 2004), ohne Ligand nicht aktiv.

Der humane PXR bindet Medikamente wie das Antibiotikum Rifampicin zur Behandlung von Tuberkulose (Lehmann *et al.*, 1998), das Antikonvulsivum Carbamazepin (Oscarson *et al.*, 2006), das Antimykotikum Clotrimazol (Lehmann *et al.*, 1998), Glucocorticoide (Persson *et al.*, 2006), Statine wie zum Beispiel Simvastatin und Lovastatin (Marino *et al.*, 2011; Lehmann *et al.*, 1998) sowie Antiretrovirale Medikamente (Mugundu *et al.*, 2010). Beispiele für Umweltgifte und PXR-Liganden sind Weichmacher und deren Zusatzstoffe wie Diethylhexylphthalat (DEHP) (DeKeyser *et al.*, 2011), Bisphenol A (BPA) (Kuzbari *et al.*, 2013) genau wie von CAR aber auch das Pestizid Chlordan (Coumoul *et al.*, 2002). Zu den endogenen Liganden gehören Steroide wie zum Beispiel 5 α -Androstan-3 α -ol und 5 β -Pregnane-3,20-dione (Bertilsson *et al.*, 1998) sowie Gallensäuren (Xie *et al.*, 2001).

Der am besten beschriebene PXR-Ligand ist Rifampicin, welches spezifisch an humanes PXR bindet. In Zellkulturversuchen wird das PXR-Zielgen CYP3A4 ca. 50-fach durch Rifampicin induziert (Goodwin *et al.*, 1999). Der am besten charakterisierte Ligand des murinen PXR ist Pregnenolon-16 α -Carbonitril (PCN) (Xie *et al.*, 2000).

Nach der Translokation in den Zellkern bildet PXR genau wie CAR ein Heterodimer mit RXR und bindet als Transkriptionsfaktorkomplex an regulatorische Elemente in der Promotorregion seiner Zielgene. Durch die Rekrutierung von gewebspezifischen Koaktivatoren oder Korepressoren wird die Transkription der Zielgene beeinflusst. PXR und CAR haben viele ihrer Zielgene gemeinsam, dementsprechend überlappen auch die Kofaktoren SRC-1, GRIP1/TIF2 sowie PGC-1 (zusammengefasst in Orans *et al.*, 2005). Weitere Kofaktoren von PXR sind ACTR, SUG-1, RIP140 sowie PBP. Dabei ist der

Phosphorylierungsstatus von PXR entscheidend für die Regulation der Genexpression, da die Interaktion mit Koaktivatoren sowie die ligandenabhängige Aktivierung durch ihn beeinflusst werden (Ding and Staudinger, 2005).

Die Hauptunterschiede in der Aktivierung von CAR (SV1) und PXR der Säugetiere sind also die hohe basale Aktivität und geringe Induzierbarkeit durch Liganden bei CAR und die niedrige basale Aktivität von PXR, welche durch Liganden stark induzierbar ist. Deswegen haben inverse Agonisten von CAR wie zum Beispiel Androstanmetabolite (Forman *et al.*, 1998), welche die basale Aktivität des CAR aufheben, eine größere Bedeutung als bei PXR (Shan *et al.*, 2004). Bei CAR unterscheidet sich die Induzierbarkeit von Zielgenen in primären Zelllinien sowie *in vivo* von Zellkulturversuchen an immortalisierten Zelllinien. Die Translokation in den Zellkern macht die substanzabhängige Aktivierung von CAR *in vivo* aus. Allerdings beziehen sich diese Aussagen nur auf die am Stärksten exprimierte Splice-Variante von CAR. Eine weitere Splice-Variante von CAR, SV2 (Tabelle 5.1 im Anhang, Seite 101), welche als zweithäufigste Variante beschrieben wird und ca. 50% der gesamten CAR-Transkripte ausmachen kann, ist basal nicht aktiv und durch Liganden aktivierbar (Arnold *et al.*, 2004; Jinno *et al.*, 2004; Auerbach *et al.*, 2003). Bisher sind die CAR-Funktionen noch nicht den einzelnen Splice-Varianten zugeordnet. Welche Splice-Variante die ursprüngliche CAR-Variante ist und ob die Bezeichnung „Wildtyp“ für die oben beschriebene Variante SV1 angemessen ist, bleibt bislang offen.

1.2.2 Molekularstruktur

CAR/PXR

CAR wird von dem Gen NR1I3 codiert. Es besteht aus 9 Exons und 8 Introns. Es sind bisher 29 Splice-Varianten beschrieben (Tabelle 5.1 im Anhang Seite 101). NR1I2, das Gen, welches für PXR codiert, besteht aus 10 Exons und 9 Introns. Von PXR wurden bisher 3 Splice-Varianten beschrieben (di Masi *et al.*, 2009).

Nukleäre Rezeptoren besitzen 4 strukturelle Domänen (Bild 1.1 A): Die N-terminale Region mit Aktivierungsfunktion (AF-1) ist eine unter den nukleären Rezeptoren variable Region. C-terminal anliegend ist die DNA-Bindedomäne (DBD), welche aus zwei Zinkfingermotiven aufgebaut ist und die regulatorischen Elemente in den Promotorregionen der Zielgene bindet. Die DNA-Bindeelemente für nukleäre Rezeptoren bestehen aus zwei Halbseiten. Diese Halbseiten sind jeweils 6 Basen lang und verschieden zueinander ausgerichtet: *inverted*, *everted* und *direct repeats* (Bild 1.1 B). Die beiden Halbseiten sind jeweils durch 0 bis 8 Basen voneinander getrennt, was sich ebenfalls in

ihrem Namen widerspiegelt. Zum Beispiel handelt es sich bei einem DR4-Element um ein hintereinander wiederholtes Halbseitenmotiv, getrennt von 4 Basen. Die DBD ist unter den nukleären Rezeptoren am stärksten konserviert. Über eine flexible Schleife („Hinge“) ist die DBD mit der Ligandenbindedomäne (LBD) verbunden. Diese beinhaltet die Ligandenbindetasche, in welcher die Liganden binden sowie die N-terminale Region mit Aktivierungsfunktion (AF-2) (di Masi *et al.*, 2009). Die nukleären Rezeptoren der NR1I-Familie haben im Vergleich zu anderen nukleären Rezeptoren eine große Ligandenbindetasche, was die Bindung strukturell unterschiedlicher Liganden und somit ein breites Ligandenspektrum ermöglicht (Jin and Li, 2010).

CAR und PXR unterscheiden sich in der Länge der AF-1-Domäne, welche bei CAR 8 Aminosäuren und bei PXR 38 Aminosäuren lang ist. Ein weiterer Unterschied ist eine interhelikale Domäne mit hoher intrinsischer Unordnung in der Ligandenbindedomäne von PXR, welche beim humanen CAR nicht vorhanden ist (Krasowski *et al.*, 2008). Dadurch ist die Ligandenbindedomäne des PXR 50 Aminosäuren länger als die des CAR. Die Ligandenbindetasche von PXR ist, abhängig vom gebundenen Liganden, 1200 Å³ bis 1600 Å³ groß und damit ungefähr doppelt so groß wie die des CAR (525 Å³ bis 675 Å³) (Molnár *et al.*, 2013). PXR ist daher in der Lage auch sehr große Liganden wie Rifampicin zu binden (Chrencik *et al.*, 2005).

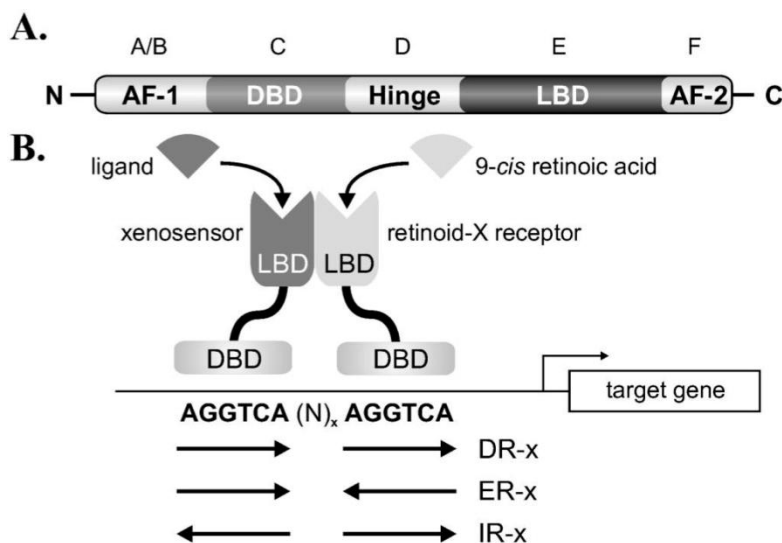


Bild 1.1: Struktur und DNA-Bindung von CAR und PXR (Handschin and Meyer, 2003)

A. Die Proteinstruktur von nukleären Rezeptoren. Nukleäre Rezeptoren bestehen aus vier Domänen: N-terminale Region (AF-1), DNA-Bindedomäne (DBD), Ligandenbindedomäne (LBD) und C-terminale Aktivierungsdomäne (AF-2).

B. Die DNA-Bindung der nukleären Rezeptoren. Der durch Liganden aktivierte nukleäre Rezeptor bindet als Heterodimer mit RXR an Bindestellen in den Promotorregionen ihrer Zielgene. Die Bindestellen bestehen aus wiederholten Hexameren mit unterschiedlichen Abständen und Orientierungen zueinander: *direct repeats* (DR), *everted repeats* (ER) oder *inverted repeats* (IR).

Strukturelle Determinanten der basalen Aktivität von CAR

Für die im Vergleich zu PXR hohe basale Aktivität des CAR wurden mehrere relevante Proteinstrukturen charakterisiert. CAR besitzt eine 4 bp lange Helixstruktur (H11' oder Hx) zwischen Helix 11 und Helix 12, welche die verkürzte Helix 12 (AF-2) auch ohne gebundenen Liganden in einer aktiven Konformation stabilisiert. Bei PXR dagegen ist die Helix 12 über eine flexible Schleife mit der Helix 10 verbunden, sodass die aktive Konformation erst durch Ligandenbindung entsteht (Xu *et al.*, 2004). Eine Insertion von 3 Alanin-Molekülen vor der Helix 11' des humanen CAR resultiert im Verlust der basalen Aktivität des Rezeptors mit gleichzeitiger Steigerung der Aktivierbarkeit durch Liganden (Kanno and Inouye, 2010). VDR, der mit CAR und PXR die Familie NR1I der nukleären Rezeptoren bildet, ist ebenfalls basal nur schwach aktiv: er besitzt eine Helix 11' die über zwei Aminosäuren mit der Helix 12 verbunden ist (Rochel *et al.*, 2000); somit ist die Konformation der H12 variabler.

Eine Splice-Variante von CAR (SV2) ist ebenfalls basal nicht aktiv, sondern durch Liganden induzierbar (Arnold *et al.*, 2004). Diese Splice-Variante besitzt ein 5 Aminosäuren langes Insert (APYLT) in Exon 8. Die Insertion eines Alanin an dieser Stelle eliminiert bereits die basale Aktivität (Chen *et al.*, 2010). Es wurde bereits in einigen Studien gezeigt, dass die Expression des Wildtyprezeptors CAR1 und der Splice-Variante SV2 in der Leber etwa gleich stark ist (Arnold *et al.*, 2004; Savkur *et al.*, 2003; Jinno *et al.*, 2004).

1.3 Klinisch relevante Arzneimittelinteraktionen

Die für den Medikamentenstoffwechsel relevantesten Enzyme und Transporter gehören zu den Zielgenen von CAR und PXR. Für die Phase I sind das zum Beispiel die Enzyme der CYP3A Familie, CYP2D6, CYP2C9, CYP2B6 und CYP1A2. Zu den Zielgenen, welche für Phase II-Enzyme kodieren, gehören unter anderem die Enzymfamilien UGTs, STs sowie GST-A (Bild 1.2).

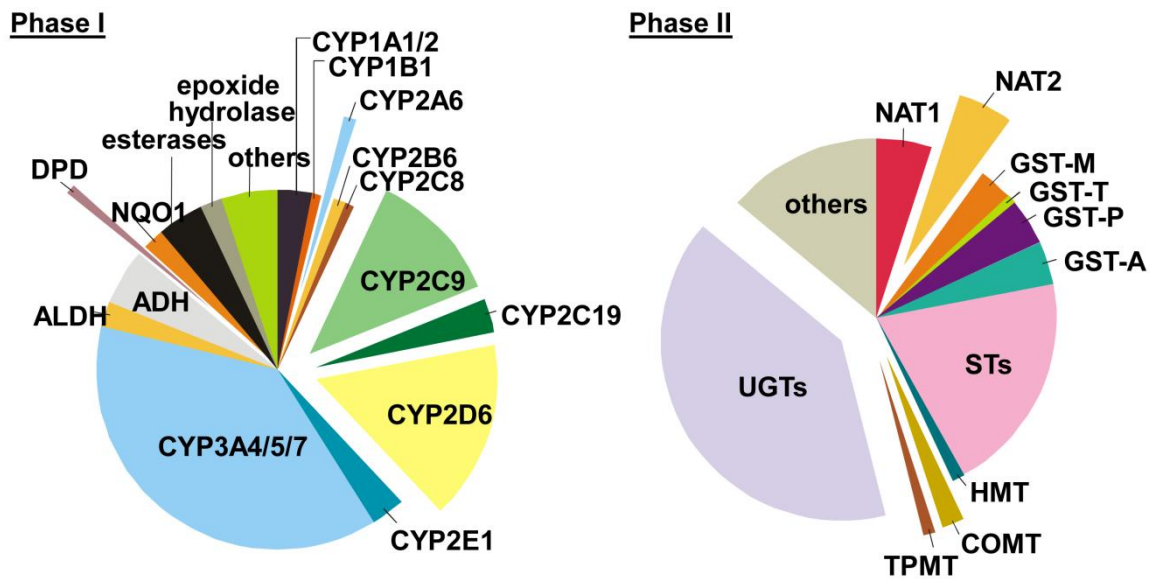


Bild 1.2: Arzneistoff-metabolisierende Enzyme (Evans and Relling, 1999)

Die Diagramme zeigen jeweils den geschätzten Anteil der verschiedenen Enzyme und Enzymgruppen der Phase I- bzw. Phase II am Metabolismus von Arzneistoffen.

ADH = Alkoholdehydrogenase, ALDH = Aldehyddehydrogenase, CYP = Cytochrom P450, DPD, Dihydropyrimidindehydrogenase, NQO1 = NADPH-Quinonoxidoreduktase oder DT-Diaphorase, COMT = Catechol *O*-methyltransferase, GST = Glutathione-*S*-transferase, HMT = Histaminmethyltransferase, NAT = *N*-acetyltransferase, STs = Sulfotransferasen; TPMT = Thiopurinmethyltransferase, UGTs = Uridine 5'-Triphosphatglucuronosyltransferases

Klinisch relevant ist die Induktion von CAR- und PXR-Zielgenen vor allem, weil sie häufig zu unerwünschten Arzneimittelinteraktionen führt. Ein 65-Jähriger nimmt im Durchschnitt 5 Medikamente gleichzeitig ein, was die Gefahren für Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Medikamenten erhöht (Cascorbi, 2012). Durch gesteigerte Enzymexpression kann die Elimination eines gleichzeitig eingenommenen anderen Medikamentes verändert werden. Dies kann zu einer signifikanten Abnahme oder sogar zu einem Verlust der Wirksamkeit dieses gleichzeitig eingenommenen Medikamentes führen. PXR-Aktivierung durch Johanniskraut, welches bei leichten bis mittelschweren Depressionen angewendet wird und frei verkäuflich ist, kann den Stoffwechsel von oralen Kontrazeptiva beschleunigen und so zu ungeplanten Schwangerschaften führen (Ernst, 1999). Ruschitzka et al. beschreiben die Abstoßung transplantierten Herzen bei zwei Patienten, die Johanniskraut und das Immunsuppressivum Cyclosporin eingenommen haben (Ruschitzka *et al.*, 2000). Ähnliche Interaktionen mit Johanniskraut wurden unter anderem

für die Antikoagulantien Warfarin und Phenprocoumon sowie für HIV-Proteinaseinhibitoren beschrieben (Henderson *et al.*, 2002).

Die Hemmung des Medikamentenstoffwechsels ist medizinisch noch relevanter, da ein zusätzlich eingenommenes Medikament dazu führen kann, dass die Plasmakonzentration eines Medikaments toxische Konzentrationen erreicht und gravierende Nebenwirkungen auftreten (Bild 1.3). Bei CAR spielen die erwähnten inversen Agonisten eine Rolle, welche die Koaktivatoren von der Ligandenbindedomäne des Rezeptors verdrängen und so die transkriptionelle Aktivierung aufheben (Forman *et al.*, 1998). Die Hemmung findet jedoch nur selten auf transkriptioneller Ebene statt, sondern meistens durch kompetitive oder allosterische Hemmung des Proteins. Dies ist vor allem relevant bei Medikamenten mit geringer therapeutischer Breite wie Cyclosporin oder Phenprocoumon (Cascorbi, 2012). Beispielsweise führte die Einnahme des Makrolidantibiotikums Erythromycin, welches die kardiale Repolarisation verlängert, in Kombination mit Cyp3A-Inhibitoren wie dem Antibiotikum und Fungizid Nitroimidazol, Diltiazem, Verapamil oder Troleandomycin zu tödlichen Herzrhythmusstörungen (Ray *et al.*, 2004). Die Hemmung von metabolisierenden Enzymen wird aber auch eingesetzt, um vor allem bei teuren Medikamenten die benötigte Dosis zu vermindern. Der HIV-Proteaseinhibitor Ritonavir ist ein Cyp3A4-Inhibitor und wird deswegen in Kombination mit anderen HIV-Proteaseinhibitoren verschrieben wie Saquinavir, welche Substrate von Cyp3A4 sind (Flexner, 2000). Ein weiteres Beispiel ist die Kombination des Cyp3A4-Inhibitors Ketokonazol mit dem Immunsuppressivum Cyclosporin, welches dann in einer 75% niedrigeren Dosis eingesetzt werden kann (Zee *et al.*, 2012).

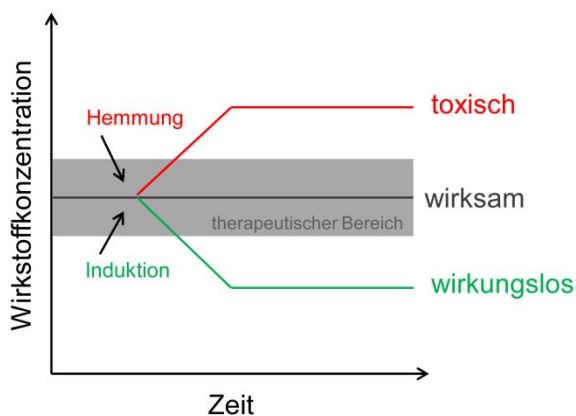


Bild 1.3: Konsequenzen eines veränderten Arzneistoffmetabolismus (eigene Darstellung)

Durch eine abweichende Inaktivierungsrate von Arzneistoffen in der Leber kann die Wirkstoffkonzentration eines Arzneistoffes den therapeutischen Bereich verlassen. Die Konzentration der Substanz kann bei Enzymhemmung den therapeutischen Bereich überschreiten und toxisch wirken oder - bei Enzyminduktion - ihre Wirksamkeit bei Konzentrationen unterhalb des therapeutischen Bereiches verlieren.

1.4 Endogene Funktionen von CAR und PXR sowie pathophysiologische Konsequenzen ihrer chronischen Aktivierung

CAR und PXR haben eine zentrale Rolle bei der Ausscheidung von Fremdstoffen, jedoch wurden innerhalb der letzten 10 Jahre immer mehr CAR- und PXR-Funktionen in endogenen Stoffwechsel- und Transportwegen aufgedeckt. Eine Störung dieser endogenen Prozesse könnte klinisch relevante, pathophysiologische Konsequenzen haben (Moreau *et al.*, 2008). Man ging bisher davon aus, dass der Aktivierungsmechanismus der Xenosensoren die Enzyminduktion auf die Zeit der Fremdstoffexposition begrenzt. Dies könnte Störungen in der Homöostase endogener Stoffwechselwege mit der Beteiligung von PXR- und CAR-Zielgenen vorbeugen. Für Langzeitbehandlung mit PXR- und CAR-Liganden sind dementsprechend verschiedene chronischen Nebenwirkungen beschrieben (Moreau *et al.*, 2008).

Eine mindestens zweiwöchige Therapie mit dem PXR-Liganden Rifampicin, welcher bei Tuberkulose eingesetzt wird, verändert die CYP3A4-gesteuerte Vitamin D-Homöostase (Wang *et al.*, 2012), was zu Osteomalazie führt (Shah *et al.*, 1981). Gleiches wurde auch für andere PXR-Liganden wie Antikonvulsiva, Glukokortikoide sowie Phenobarbital gezeigt (Holick, 2005).

Weitere Stoffwechselwege, welche durch CAR- sowie PXR-Liganden beeinflusst werden, sind der Hämoglobin-Abbau zu Bilirubin, die Gallsäureausscheidung sowie die Thyroid- und Steroidhormonhomöostase. Eine Anreicherung von Bilirubin, welche zur Gelbsucht führen kann, wird beispielsweise durch den CAR-Aktivator Phenobarbital vermindert (Huang *et al.*, 2003). CAR- und PXR-Aktivatoren haben ebenfalls einen positiven Effekt auf die Gallensäureausscheidung und schützen vor einer Hepatitis durch toxische Anreicherungen von Gallensäuren (di Masi *et al.*, 2009). Die Auswirkungen auf den Thyroidhormonhaushalt sind dagegen negativ, da eine T4-Abnahme hier zu Vergrößerungen der Schilddrüse führt. Die Steroidhormonhomöostase ist komplex, da Steroidhormone sowohl Agonisten als auch inverse Agonisten der nukleären Rezeptoren sind. Viele Zielgene von CAR und PXR wie zum Beispiel CYP3A4 und CYP1A2 (Beierle *et al.*, 1999) werden geschlechtsspezifisch reguliert, unter anderem weil Sexualhormone zu ihren Liganden gehören (Ledda-Columbano *et al.*, 2003). Rifampicin kann bei der Einnahme während der Schwangerschaft teratogen wirken. Dies könnte ebenfalls durch einen gesteigerten Steroidhormonstoffwechsel nach PXR-Aktivierung erklärt werden (Ma *et al.*, 2008).

In einer Reihe von klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass CAR- sowie PXR-Aktivatoren den Energiestoffwechsel in der Leber beeinflussen (Moreau *et al.*, 2008; Ma *et al.*

al., 2008). In einer Studie mit Tuberkulosepatienten wurde gezeigt, dass Rifampicin als PXR-Ligand eine Fettleber verursacht (Morere *et al.*, 1975). Ähnliches konnte auch für Carbamazepin gezeigt werden, welches vereinzelt eine Fettleber oder sogar Steatohepatitis hervorrufen kann (Grieco *et al.*, 2005). Akute CAR-Aktivierung bei Epileptikern durch Phenobarbital gegeben in Kombination mit Valproat verursacht ebenfalls eine Fettleber (Löscher *et al.*, 1993). Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass CAR und PXR die Lipogenese sowie die Glukoneogenese hemmen (zusammengefasst in Wada *et al.*, 2009). In Tierversuchen wurden demzufolge therapeutische Nutzen von CAR- und PXR-Liganden bei Adipositas und Diabetes angedeutet:

Der CAR-Aktivator Phenobarbital verbesserte die Insulinresistenz und steigerte den Glukose- und Fettstoffwechsel von diabetischen Ratten (Venkatesan *et al.*, 1994). Für TCPOBOP, den Liganden des murinen CAR, wurde gezeigt, dass er bei wöchentlicher Gabe für 4 bis 8 Wochen Mäuse mit fettreicher Diät vor Adipositas sowie einer Fettleber schützt und deren Insulinsensitivität sowie Glukosetoleranz verbessert (Gao *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2009). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Bluthochdruck und Proteinurie bei adipösen, trächtigen Mäusen durch TCPOBOP behandelt werden können (Masuyama and Hiramatsu, 2012a) und dass durch die Behandlung während der Trächtigkeit die Nachkommen vor Insulinresistenz geschützt werden können (Masuyama and Hiramatsu, 2012b). In einer Studie mit Diabetespatienten wurde gezeigt, dass Phenobarbital den Serum-Glukosespiegel senkt und die Insulinsensitivität verbessert (Lahtela *et al.*, 1985).

Für PCN, den Liganden des murinen PXR, konnte gezeigt werden, dass er vor Adipositas durch fettreiche Diät schützt. Die PXR-Aktivierung verhinderte die Fettspeicherung im Fettgewebe sowie in der Leber durch einen erhöhten Energieverbrauch im braunen Fettgewebe (Ma and Liu, 2012).

Zusammengefasst könnten CAR- sowie PXR-Liganden einen neuen pharmakologischen Ansatz gegen Adipositas und Diabetes Typ II darstellen (Dong *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2009). Neuste Studien zeigen, dass Metformin, das bei Diabetes Typ 2 am häufigsten eingesetzte Medikament, die CAR-Translokation und somit seine Aktivierung blockiert (Yang *et al.*, 2013). Eine Fettleber wurde jeweils in Experimenten nach akuter CAR- oder PXR-Aktivierung beobachtet, bei Langzeittherapien mit CAR-Liganden wurden Verbesserungen der Fettleber beobachtet: Dong *et al.* behandelten Leptin-Knockout-Mäuse als Modell für Diabetes Typ 2 einen Monat lang mit TCPOBOP, was zu einer CAR-vermittelten Abnahme des hepatischen Lipidgehaltes vermutlich durch Hemmung der Lipogenese führte (Dong *et al.*, 2009). Unklar bleiben die genauen Mechanismen, wie zum Beispiel die beschriebene Hemmung (zusammengefasst in Wada *et al.*, 2009; Löscher *et al.*, 1993) oder Induktion (Dong *et al.*, 2009) des Lipidkatabolismus über die β -Oxidation durch CAR-Liganden erfolgt.

Weitere Funktionen der nukleären Rezeptoren wurden bei Entzündungsreaktionen und Krebs entdeckt. Eine negative Korrelation zwischen Entzündungsreaktionen und dem

Medikamentenstoffwechsel wurde mit PXR verknüpft. Rifampicin als PXR-Aktivator bewirkt eine Immunsuppression (Chai *et al.*, 2013). PXR-Knock-Out-Mäuse erkrankten passend zu diesem Befund öfter an chronisch entzündlichen Dünndarmerkrankungen (Zhou *et al.*, 2006). Umgekehrt wurde bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine verminderte PXR-Expression gemessen (Langmann *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2007).

Die Entstehung von Leberkrebs in Mäusen nach Phenobarbital ist CAR-abhängig. Der direkte Ligand des murinen CAR, TCPOBOP, induziert eine starke Proliferation von Hepatozyten bei Nagern. Die Karzinogenität von CAR-Aktivatoren beim Menschen ist umstritten (Köhle *et al.*, 2008).

1.5 Dauerhafte Veränderungen des Fremdstoffmetabolismus nach transienter Fremdstoffexposition

Neben der chronischen Aktivierung von CAR und PXR zeigten Chen *et al.* kürzlich (Chen *et al.*, 2012), dass sogar eine einmalige, transiente Fremdstoffexposition die Genexpression von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen dauerhaft verändern kann. Chen *et al.* zeigten, dass 2 von 21 untersuchten CAR-Zielgenen, Cyp2b10 sowie Cyp2c37, nach einer einmaligen Injektion des murinen CAR-Liganden TCPOBOP in neugeborene Mäuse für mindestens 24 Monate extrem stark induziert waren. Es wurde postuliert, dass diese Enzyminduktion auf dauerhafte epigenetische Veränderungen zurückzuführen ist. Gezeigt wurden spezifische Veränderungen von Histonmethylierungen in den Promotorbereichen dieser Gene. Im Vergleich zu Genen, welche nur für kurze Zeit induziert wurden, zeigten Cyp2b10 sowie Cyp2c37 gesteigerte H3K3-Mono-, Di- und Trimethylierung sowie eine verminderte H3K9-Trimethylierung und H3K27-Trimethylierung (Chen *et al.*, 2012).

Ein genomweites epigenetisches Profil von Mäusen nach einer vierwöchigen Phenobarbitalbehandlung zeigte DNA-Hypomethylierung am Cyp2b10 Promotor sowie eine Veränderung der Histonmodifikationen vom reprimierten H3K27-Trimethylierungsreichen zum aktiven H3K4-Dimethylierungs-, H3K9-Acetylierungs- sowie H3K27-Trimethylierungsarmen Cyp2b10 Promotor (Lempiäinen *et al.*, 2011).

Alternativ zu Langzeiteffekten einer Einzelgabe können dauerhafte Genexpressionsänderungen auch durch eine Akkumulation von Substanzen in Körperkompartimenten wie dem Fettgewebe oder gebunden an Albumin verursacht werden. Aus solchen Depots können Medikamente über einen langen Zeitraum hinweg langsam in den Kreislauf abgegeben werden.

Poland *et al.* zeigten bereits 1980 (Poland *et al.*, 1980) eine Akkumulation der lipophilen Substanz TCPOBOP im Fettgewebe. Ermittelt wurde eine ED₅₀ von 1,63 x 10-

7 mol/kg/Tag. Eine maximal effektive Dosis des potenten Induktors von 3mg/kg, genau wie bei Chen et al. führte zu einer mindestens 20-wöchigen Induktion der Aminopyridine N-demethylase.

Übereinstimmend mit einer TCPOBOP Akkumulation von TCPOBOP im Körper sind auch die Ergebnisse von Smith et al. (Smith *et al.*, 1993). Gezeigt wurde unter anderem eine über mindestens 12 Wochen andauernde Induktion verschiedener Cyp-Enzyme wie Cyp1a, Cyp2a, Cyp2b und Cyp2c auf Proteinebene. Smith et al. diskutierten als Erklärung ebenfalls eine Akkumulation des extrem potenten CAR-Induktors TCPOBOP im Fettgewebe.

1.6 Multi- und transgenerationale Effekte

Dass dauerhafte Veränderungen in der Genexpression auch an die nächste Generation weitergegeben werden können, wurde in der Literatur an mehreren Beispielen belegt. Man bezeichnet dabei die multigenerationale Effekte als Weitergabe an die nächste Generation. Diese Generation entsteht aus Keimzellen, welche zum Zeitpunkt der Exposition bereits angelegt waren. Eine Weitergabe über mehrere Generationen wird als transgenerational bezeichnet, wenn die Keimzellen für die entstehende Generation keinen Kontakt zum Fremdstoff hatten. Bei der Exposition einer Schwangeren spricht man demnach erst in der F₃-Generation von einer transgenerationalen Weitergabe (Skinner, 2008). Von „Vererbung“ spricht man jeweils nur, wenn ein Phänotyp durch epigenetische Veränderung der DNA und Weitergabe dieses über die Keimbahn stattgefunden hat.

Bisher ist wenig über Nebenwirkungen von Medikamenten für die folgenden Generationen bekannt. In die Risikobewertung fließen derzeit nur Folgen der fetalen Exposition im Mutterleib ein. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist das Auftreten von *Spina Bifida* nach Valproat-Einnahme während der Schwangerschaft (Robert, 1983). Außerdem wurden der mutagene Effekt von Zytostatika auf die Keimbahn sowie die resultierenden Konsequenzen für die nächste Generation untersucht.

Multi- und transgenerationale Effekte nach präkonzeptioneller Exposition wurden bisher vor allem unter toxikologischen Gesichtspunkten bei der Risikobewertung von Umweltgiften untersucht. Das Fungizid Vinclozin vermindert beispielsweise die männliche Fertilität von bis zu vier Folgegenerationen (Anway *et al.*, 2005). Ein anderes Beispiel ist das endokrin wirksame Bisphenol-A, welches die Genexpression in Hoden bis zur dritten Generation verändert (Salian *et al.*, 2009).

Ein weiterer Forschungsschwerpunkt war bisher der transgenerationale Einfluss von Ernährung. Hierzu wurden mehrere epidemiologische Studien durchgeführt. Ein berühmtes Beispiel sind die Untersuchungen an Kindern, welche während der Hungersnöte im Winter 1945 in den Niederlanden ausgetragen wurden. Verschiedene Studien sind hier zu widersprüchlichen Effekten in der folgenden Generation gekommen: Nur maternale (Painter *et al.*, 2008) bzw. nur paternale (Veenendaal *et al.*, 2013) Einflüsse auf ein höheres Körpergewicht sowie einen größeren BMI wurden postuliert.

Die Zusammenfassung von elf Studien an Ratten ergibt ein höheres Risiko für Typ-II-Diabetes und Adipositas für Nachkommen von Müttern mit fettreicher Diät während der Schwangerschaft (Ainge *et al.*, 2011). Metabolische multigenerationale Effekte sowie vermindertes Wachstum wurden an einer Studie mit Mäusen gezeigt: Die Nachkommen adipöser, trächtiger Mäuse blieben unbeeinflusst, die F₁-Generation hingegen zeigte maternale sowie paternale multigenerationale Effekte (King *et al.*, 2013).

Zusammenfassend könnten nicht nur genetische Polymorphismen die individuelle Empfindlichkeit für Fremdstoffe bzw. Krankheiten beeinflussen, sondern ebenso (epigenetische) Unterschiede, welche im Verlauf des Lebens durch Fremdstoffexposition entstanden sind (Christensen *et al.*, 2009; Mirbahai and Chipman, 2013).

1.7 Evolution von PXR und CAR / Variabilität im Fremdstoffmetabolismus der Arten

Den beschriebenen unmittelbaren Anpassungen an die Umwelt durch Induktion des Fremdstoffmetabolismus auf transkriptioneller Ebene, sowie durch länger andauernde multi- sowie transgenerationale Effekte, stehen die evolutionären Anpassungen gegenüber. Die evolutionären Anpassungen betreffen erbliche Mutationen der Genomsequenz in der Keimbahn im Verlauf der Zeit. Auch diese dauerhaften Merkmalsveränderungen können mit Anpassungen der Lebewesen an den jeweiligen Lebensraum verbunden sein.

Gene, die eindeutig als CAR-Homologe bezeichnet werden können, waren zu Beginn dieser Dissertation nur bei Säugetieren beschrieben. PXR wurde als ancestrales Gen der CAR Gene von Säugetieren beschrieben (Handschin *et al.*, 2004; Krasowski *et al.*, 2011b). Unklar war bisher die Orthologie von CXR, dem *chicken X receptor* des Huhns (gg), dessen Proteinsequenz sich gleich stark von PXR und CAR unterscheidet und somit als ancestrales Gen von PXR und CAR der Säugetiere in Frage kam (Handschin *et al.*, 2000; Handschin *et al.*, 2004). Dr. H. Qiu konnte während der Datenerhebung für diese Arbeit zeigen, dass CAR, PXR und VDR bereits durch eine vollständige Genomduplikation in

den frühen Vertebraten entstand (Bild 1.4 A). Die CAR-Gene gingen auf der Linie der Fische verloren, sind aber in allen Taxa der Vertebraten konserviert. PXR hingegen wurde bei den meisten Fischarten gefunden. Sauropsida haben kein PXR (Bild 1.4 B). Das dem PXR orthologe Gen der Amphibien, BXR, codiert für den Benzoate X Rezeptor, welcher spezifisch Benzoate bindet (Blumberg *et al.*, 1998) und damit im Vergleich zum humanen PXR ein sehr kleines Substratspektrum hat. Genauso spezifisch wie sein Substratspektrum ist auch seine bisher beschriebene Funktion in der Entwicklung der Amphibien (Blumberg *et al.*, 1998). Im Fremdstoffmetabolismus spielt BXR also aufgrund seiner Substrate und seiner Expression im Gehirn sowie den Gonaden keine Rolle (Heath *et al.*, 2000; Grün *et al.*, 2002).

Die Stammbaumanalyse in Kombination mit der Analyse der flankierenden Gene klassifizierte CXR eindeutig als CAR ortholog. Darüber hinaus wurden CAR-Genloci bei Reptilien (*Anolis carolinesis* (ac)) sowie Amphibien (*Xenopus tropicalis* (xt) und *Xenopus laevis* (xl)) identifiziert. Diese Ergebnisse waren besonders interessant, da bei Reptilien und Amphibien bisher noch kein Fremdstoffrezeptor mit breitem Substratspektrum beschrieben war. Gerade bei Amphibien, der bedrohtesten Tiergruppe weltweit (IUCN Rote Liste, Version 2012.2), die wegen ihrer dünnen, durchlässigen Haut und ihrer aquatischen Lebensweise besonders häufig in Kontakt mit Fremdstoffen kommt, wäre die Charakterisierung von Fremdstoffrezeptoren und ihren Zielgenen von besonderer Bedeutung.

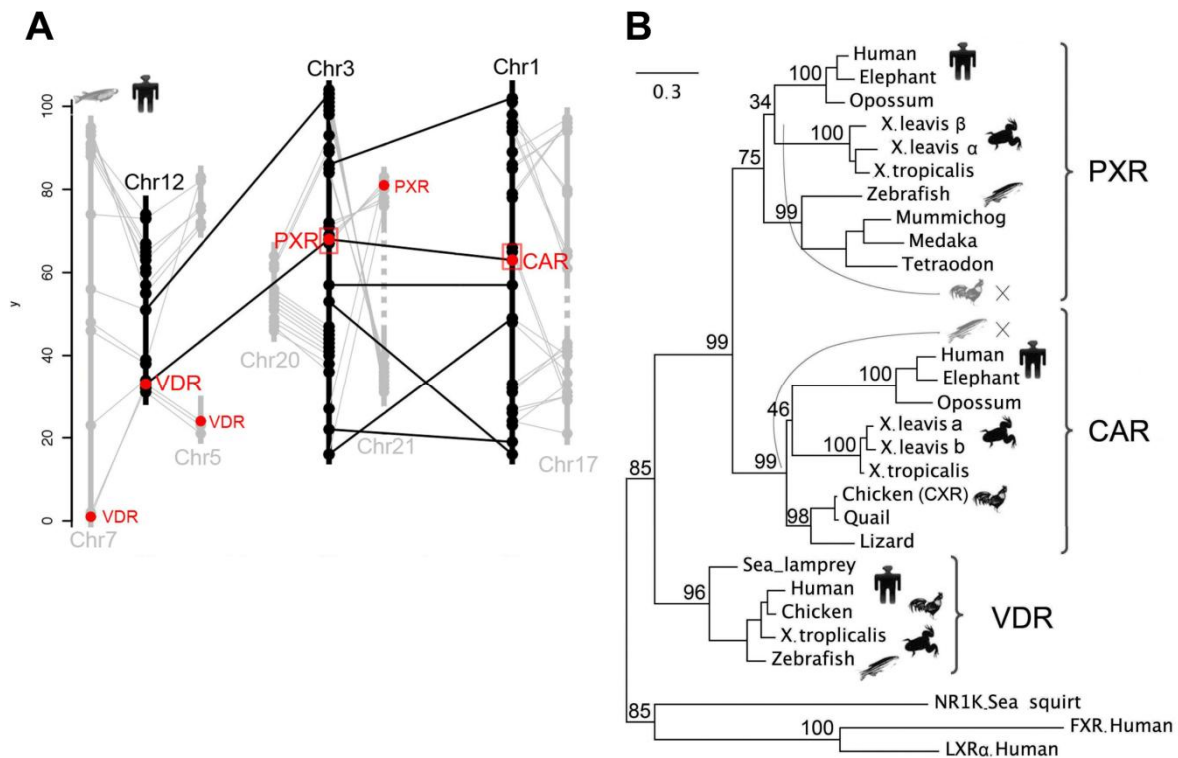


Bild 1.4: Evolution der NR1I-Genfamilie (Mathäs et al., 2012)

A) Makrosyntenie unter den humanen CAR-, PXR- und VDR-Genregionen sowie zwischen den orthologen Regionen von Mensch und Medaka. Schwarze Linien verbinden jeweils humane Paraloge miteinander, welche vor der Abspaltung der Knochenfische von den Landvertebraten dupliziert wurden. Orthologe von Mensch und Medaka sind durch graue Linien verbunden. Vertikale graue gestrichelte Linien beschreiben größere nicht-orthologe Bereiche. B) Maximum-likelihood Baum der NR1I-Gene von Vertebraten. NR1K von Seescheiden sowie die humanen Gene LXR α und FXR wurden als Außengruppen benutzt. Der Verlust (x) von PXR bei Vögeln und Reptilien, hier durch den Hahn dargestellt sowie bei Fischen wird in grau dargestellt. Die Bootstrap-Werte sind über den jeweiligen Ästen angegeben.

1.8 Ziele der Arbeit

Dauerhafte Änderungen der Genexpression von CAR- sowie PXR-Zielgenen könnten schwerwiegende Konsequenzen für die betroffenen Individuen haben. Dazu gehören ein abnormaler Medikamentenstoffwechsel sowie abweichende Dispositionen für verschiedene Krankheiten wie Diabetes oder Krebs.

Ein Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob CAR- sowie PXR-vermittelte Genexpressionsänderungen über die Keimbahn weitergegeben werden können.

Hierfür sollte zunächst das gesamte Spektrum der CAR-vermittelten, dauerhaften Genexpressionsänderungen in der Elterngeneration bestimmt werden. Bisher wurden von Chen et al. (Chen *et al.*, 2012) lediglich 21 CAR-Zielgene auf Langzeitaktivierung überprüft. Berücksichtigt man die enge evolutionäre Verwandtschaft der nukleären

Rezeptoren, sind Langzeitveränderungen auch für PXR denkbar und sollten im Verlauf dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden. Da Erwachsene aufgrund ihrer Lebensdauer sowie der absoluten Krankheitshäufigkeit wesentlich häufiger in Kontakt mit Medikamenten kommen, war auch von besonderem Interesse, ob anhaltende Genexpressionsänderungen auch nach Exposition von Erwachsenen zu beobachten sind.

Anschließend sollten multi- sowie transgenerationale Effekte einer transienten Fremdstoffexposition mit dem murinen CAR-Liganden TCPOBOP sowie des murinen PXR-Liganden PCN *in vivo* an neugeborenen als auch an erwachsenen Mäusen untersucht werden.

Erkenntnisse aus diesen Versuchen können hilfreich sein für die Vorhersage der individuellen Kapazität des Fremdstoffmetabolismus und den möglichen resultierenden Nebenwirkungen sowie für die Identifikation krankheitsprädisponierender Faktoren. Diese Hinweise könnten relevant für die Bewertung der Sicherheit von Medikamenten werden und in die Pharmakovigilanzprüfungen einfließen.

Unerwünschte Nebenwirkungen besser vorhersagen oder sogar verhindern zu können, erfordert eine gezielte Modulierung der Funktion sowie Aktivität der nukleären Rezeptoren. Die Proteinfunktion der nukleären Rezeptoren und Fremdstoffsensoren PXR und CAR, welche beim Menschen eine Schlüsselrolle im Medikamentenstoffwechsel haben, sollte bei Nichtsäugetieren näher untersucht werden. Diese Vergleiche zwischen den Rezeptoren verschiedener Arten sollten ein besseres Verständnis der Funktionsweise der humanen Proteine ermöglichen. Ein detaillierteres Verständnis der Struktur von nukleären Rezeptoren ermöglicht die Identifizierung von Liganden sowie deren Aktivität und Nebenwirkungen. Eine selektive Aktivierung bestimmter Zielgene gehört zu den Langzeitzielen der pharmakologischen Forschung.

Dafür sollte CAR als Modulator besonders vieler metabolischer Stoffwechselwege im Verlauf dieser Arbeit anhand eines neu identifizierten Rezeptors bei Amphibien charakterisiert werden. Bei Amphibien, welche aufgrund ihrer aquatischen Lebensweise sowie ihrer dünnen, durchlässigen Haut im direkten Austausch mit ihrer Umwelt stehen, wurde bisher kein Fremdstoffrezeptor mit breitem Ligandenspektrum beschrieben. Die von Dr. H. Qiu im Genom von Reptilien und Amphibien identifizierten CAR sollten funktionell und strukturell charakterisiert werden, um ein tieferes Verständnis für den humanen Rezeptor zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 RNA-Extraktion

Für die Isolierung von RNA aus Leberproben wurden ein *Xenopus laevis* Weibchen aus der Zoohandlung „Fauna Exotika“ in Mainz, ein *Anolis carolinensis* Weibchen aus der Zoohandlung „Aquatika“ in Worms sowie Mäuse aus der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz benutzt. Hepatische RNA der Art *Xenopus tropicalis* wurde von Professor Thomas Hankeln aus dem Institut für Molekulargenetik in Mainz zur Verfügung gestellt. Die RNA-Extraktion erfolgte mit „peqGOLD TriFast™“ (Peqlab) entsprechend eines leicht abgeänderten Protokolls: ungefähr 30 mg Leber wurden in 1 ml „peqGOLD TriFast™“ mit dem TissueLyser (Peqlab) für 2-4 min bei 50 Hz zerkleinert. Nach einer 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0,2 ml Chloroform zugegeben und die Proben 15 sec kräftig geschüttelt. Für eine Phasentrennung wurden die Proben erneut 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und danach 15 min bei 13.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5 ml Isopropanol gemischt und für die RNA-Fällung mindestens eine Stunde bei -20°C gelagert. Im Anschluss wurde das RNA-Präzipitat 20 min bei 12.000 x g und 4°C abzentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde 2 Mal mit -20°C kaltem 75% Ethanol gewaschen und 20 min bei 12.000 x g und 4°C abzentrifugiert. Zum Schluss wurde das luftgetrocknete Pellet in 100 µl mit Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser bei 55°C und 500 UpM für 10 min im Heizblock gelöst. Die Konzentration wurde mit 1,4 µl der Lösung am NanoDrop® ND-1000 (Peqlab) gemessen und die RNA wurde bei -80°C gelagert.

Die RNA aus Lebern neugeborener Mäuse wurde mit dem „RNeasy Kit“ von Qiagen nach Protokoll des Herstellers isoliert. Hierfür wurden nur ca. 10 mg Gewebe mit den TissueLyser (Peqlab) für 2 min bei 50 Hz zerkleinert.

2.1.2 RNA Qualitätskontrolle und Hochdurchsatz-Sequenzierung

RNA Proben, welche mit *Next Generation Sequencing* analysiert werden sollten, wurden vorher mittels automatisierter Elektrophorese (Experion™, BioRad) auf ausreichende Qualität überprüft. Hierfür wurde das „Experion™ RNA StdSens Analysekit“ (Biorad) benutzt. Bei ausreichender Qualität aller Proben wurden die Proben der einzelnen Versuchsgruppen mit gleichen Mengenanteilen zusammengeführt. Die cDNA-

Bibliotheken wurden von der Firma GENterprise GEMOMICS GmbH (Mainz) erstellt. Die Hochdurchsatz-Sequenzierung erfolgte mit dem Illumina HiSeq 2000 am Institut für Molekulargenetik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit sequenzierten 12 Proben wurden auf 2 Lanes einer Flowcell sequenziert. Es wurde eine Multiplexsequenzierung durchgeführt, bei welcher die Bibliotheken jeder Probe zu gleichen Anteilen auf jede Lane aufgetragen wurden. Die Sequenzfragmente wurden jeweils vom 5'- sowie 3'-Ende sequenziert (paired-end Sequenzierung), sodass jeweils zwei *reads* pro Sequenzfragment vorlagen. Die sequenzierten Proben ergaben zwischen 25 Millionen und 48 Millionen Sequenzfragmente.

2.1.3 Bioinformatische Datenanalyse der Hochdurchsatz-RNA-Sequenzierung

Folgende Datenanalyseschritte wurden in angegebener Reihenfolge mithilfe von Pipelines im Betriebssystem Linux (Ubuntu) durchgeführt.

2.1.3.1 Qualitätskontrolle

Die Rohdaten der Illumina-Sequenzierung werden als FASTQ-Formate ausgegeben. Diese Rohdaten wurden zunächst mit dem Programm FastQC Version 0.10.1 (The Babraham Institute, Cambridge, UK) analysiert. Überprüft wurden die Anzahl, die Längen sowie die Basenzusammensetzung der Sequenzen. Außerdem wurde die Häufigkeit einzelner Sequenzen kontrolliert: Die meisten Fragmente kamen nur einmal vor.

2.1.3.2 Entfernen von Sequenzabschnitten

Zeigte die Qualitätskontrolle große Abweichung in der Basenzusammensetzung an einzelnen Positionen der Sequenzen wurden diese abgeschnitten. Die analysierten Proben wurden jeweils am 5'-Ende der Sequenz um eine Base gekürzt. Hierfür wurde das Programm FASTQ-Trimmer des FASTX-Toolkit Version 0.0.13 (Cold Spring Harbor Laboratory, New York) verwendet.

2.1.3.3 Alignieren der Sequenzen am Genom

Die kurzen Sequenzen („reads“) der Hochdurch-Satzsequenzierung wurden im nächsten Schritt mit der Referenzsequenz aligniert. Für die analysierten Leberproben der Mäuse wurde die genomische Sequenz der Maus (Version mm10) benutzt. Dieses sogenannte „Mapping“ wurde mit dem Programm TOPHAT Version 2.0.8 durchgeführt. TOPHAT benutzt zum Alignieren der Sequenzfragmente Bowtie (Bowtie 1, Version 0.12.9.0), danach analysiert das Programm die Exongrenzen, um Splice-Varianten zu detektieren. Es konnten für

jede Probe über 90% der Reads aligniert werden. Die Anzahl der Reads pro Probe sowie die Anzahl der jeweils detektierten Gene sind im Anhang dargestellt (Tabelle 5.6, Seite 105).

2.1.3.4 Erstellen eines Genexpressionsprofils

Die Expressionsstärke der einzelnen Gene wurde mit cufflinks Version 2.0.2 (University of California, Berkeley, USA) ermittelt. Cufflinks fügt zunächst die alignierten Sequenzen zu Transkripten zusammen. Nach einer Normalisierung wird die Anzahl der Sequenzfragmente als Maß für die Expressionsstärke benutzt. Normalisiert wird auf die jeweilige Länge des Transkripts sowie die Anzahl der alignierten Sequenzen insgesamt: Die Expressionsstärke wird dementsprechend als „*Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped*“ (FPKM) angegeben.

2.1.3.5 Analyse der differentiellen Expression

Um differentiell exprimierte Gene in den unterschiedlichen Versuchsgruppen zu identifizieren, wurde das Programm cuffdiff Version 2.0.2 (University of California, Berkeley, USA) verwendet. Dieses Programm benutzt cufflinks, um die Genexpressionsstärke zu bestimmen und sucht nach signifikanten Unterschieden zwischen einzelnen Proben. Von cuffdiff mit „NOTEST“ gekennzeichnete Gene, welche durch die Sequenzierung nicht genügend abgedeckt waren, wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen.

2.1.3.6 Gruppierung der differentiell exprimierten Gene und Signalweg-Analyse

Um die Gene zu gruppieren sowie Gene zu detektieren, welche in mehreren Proben ähnlich reguliert sind, wurde eine hierarchische Clusteranalyse (*centroid linkage*) mit „cluster 3.0“ durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm „Java Treeview“.

Die Signalweg-Analyse erfolgte mit dem Programm Ingenuity. Für die Signalweg-Analyse wurden nur Gene benutzt, welche sich in ihrer Expressionsstärke mindestens um das 2-fache von der Kontrollgruppe unterschieden.

2.1.4 Chip Microarray

Genomweite Genexpressionsprofile von Leber- sowie Nierenproben von weiblichen *Xenopus laevis* wurden mit Microarrays erstellt. Die einzelnen RNA-Proben einer Versuchsgruppe wurden zu gleichen Mengenanteilen zusammengefügt. Die reverse Transkription, die Hybridisierung an den GeneChip X. laevis 2.0 (Affymetrix, Santa Clara,

CA) sowie die Normalisierung der Rohdaten mittels *robust multiarray analysis* (RMA) wurden von der Firma AltasBiolabs (Berlin) durchgeführt. Die erhaltenen Rohdaten wurden in der *Gene Expression Omnibus* (GEO) Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Bethesda, MD, USA) unter der Accession-Nummer GSE28510 hinterlegt. Die weitere Auswertung der Daten erfolgte mit Excel.

2.1.5 Reverse Transkription für quantitative PCR

Das Umschreiben von RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mit dem „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ (Applied Biosystems) genau nach Protokoll des Herstellers. Pro Reaktion wurde 1 µg RNA in einem 20 µl Ansatz benutzt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.1.6 Quantitative PCR

Die Quantifizierung einzelner Gene erfolgte mittels quantitativer PCR (qPCR). Es wurden entweder TaqMan-Assays oder eine Quantifizierung mit SYBR-Green durchgeführt. Primer sowie Sonden wurden nach Literaturangaben hergestellt oder selbst entworfen (Tabelle 2.1). Angesetzt wurden die Reaktionsansätze wie in Tabelle 2.2 angegeben. Die Amplifikation von Cyp2b10 sowie Cyp3a11 erfolgte mit einer Effizienz von 95% bis 100%, was anhand einer Verdünnungsreihe mit mindestens 5 Konzentrationen belegt wurde. Das Produkt für Cyp2c27 wurde sequenziert und enthält ebenfalls Sequenzen von Cyp2c29, Cyp2c50 sowie Cyp2c54. Aufgrund der Sequenzhomologie von über 90% konnten keine spezifischeren Primer oder Sonden entworfen werden. Es wurde der StepOnePlus™ Cyclyer (Applied Biosystems) mit folgendem Programm benutzt: Anfangsdenaturierung bei 95°C für 5 min gefolgt von 40 Zyklen mit 15 sec Denaturierung bei 94°C sowie Annealing und Elongation für eine Minute bei 60°C. Für SYBR-Green-Experimente wurde eine Schmelzkurve erstellt. Die Auswertung erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta ct}$ -Methode genau nach Protokoll (Livak and Schmittgen, 2001).

Tabelle 2.1: Primer für quantitative PCR

Gen	Assay	Sequenz	Literatur
Cyp2b10	TaqMan	fw: GACTTTGGGATGGGAAAGAG rv: CCAAACACAATGGAGCAGAT Sonde: ACGTTCCTCTTCCAGTGCATCAC	(Chen <i>et al.</i> , 2012) Sonde: selbst entworfen
Cyp2c37	SYBR	fw: TGACCTCATCCCCAACAGC rv: GGGAACCTCCGTGCTGTCAT	selbst entworfen, unspezifisch (siehe Text)
Cyp3a11	TaqMan	fw: AGAACTTCTCCTTCCAGCCTTGTA rv: GAGGGAGACTCATGCTCCAGTTA Sonde: CTAAAGGTTGTGCCACGGGATGCAGT	(Gnerre <i>et al.</i> , 2005)

Tabelle 2.2: Reaktionsansatz quantitative PCR

Taq-Man Assay		
Template	2 µl	1:1 Verdünnung der cDNA
Wasser	ad 20 µl	
10xPuffer	2 µl	200 mM Tris HCl (pH 8,7), 100 mM (NH ₄)SO ₄ , 40 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O, 100 mM KCl
Primer	2 µl	10 µM
Sonde	1 µl	10 µM
dNTPs	0,5 µl	20 mM
Taq	0,5 µl	hergestellt von Herrn Prof, Dr. Kleinert, Institut für Pharmakologie, Mainz
SYBR-Green Assay		
Template	2 µl	1:1 Verdünnung der cDNA
Wasser	ad 20 µl	
Mix (Quanta)	10 µl	PerfeCTa SYBR [®] Green Fast Mix [®] ROX (Quanta)
Primer	0,4 µl	10 µM

Angegeben sind die Mengen pro Reaktion.

2.1.7 Klonierung des Constitutiven Androstane Receptors (CAR) von Amphibien und Reptilien

Die aus 100 ng hepatischer RNA gewonnene cDNA wurde für eine Amplifikation mittels PCR eingesetzt. Alle Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 25 µl mit 2,5 µM je Primer (siehe Tabelle 2.3), 0,2 mM jedes dNTPs, 1,25 U Velocity DNA Polymerase (Bioline) sowie dem passenden 5x Puffer durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Programm: 2 min initiale Denaturierung bei 94°C gefolgt von 33 Zyklen mit 30 sec Denaturierung bei 94°C, 30 sec Annealing und 1:25 min Elongation bei 72°C. Es wurde eine Endelongation bei 72°C für 5 min angeschlossen.

Die PCR-Produkte sowie der Vektor pCDNA3 (Invitrogen) wurden mit den entsprechenden Enzymen (New England Biolabs) (Tabelle 2.3) mindestens 16 Stunden bei 37°C verdaut. Anschließend wurden die Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit dem GeneJetTM Gel Extraction Kit nach Protokoll des Herstellers isoliert. Die überhängenden Enden des PCR-Produkts und des Vektors wurden mit einer T4-Ligase (New England Biolabs) im 10 µl Ansatz über Nacht bei 4°C ligiert.

Letztlich wurden 5 µl des Ligationsansatzes für die Hitzeschock-Transformation in NEB 10-beta Competent *E. coli* (New England Biolabs) nach folgendem Protokoll verwendet: 25 µl kompetente Bakterien wurden 10 min auf Eis aufgetaut, danach mit 5 µl eines Ligationsansatzes vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis gestellt. Es folgte eine Hitzeschockbehandlung für 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 5 min wurden 475 µl raumtemperiertes SOC-Medium (New England Biolabs) zugegeben und für 60 min bei 37°C und 250 UpM inkubiert.

Anschließend wurden jeweils 75 µl und der Rest dieses Ansatzes auf Ampicillin-LB-Agarplatten ausgestrichen. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank wurden Kolonien für eine Mini-Präparation gepickt und wiederum über Nacht bei 37°C und 250 UpM in 3 ml Ampicillin-LB Medium geschüttelt.

Am nächsten Tag konnte die DNA mit dem „GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit“ (Fermentas) isoliert werden und bei der Firma GENTERprise GEMOMICS GmbH (Mainz) mit den Primern T7 und Sp6 sequenziert werden. Von jeder Art wurden zwanzig Klone sequenziert.

Tabelle 2.3: Primer für die Klonierung der konstitutiven Androstane Rezeptoren von *Xenopus laevis*, *Xenopus tropicalis* sowie *Anolis carolinensis*

Name	Anneal. Temp.	Sequenz	Restriktionsenzym
xl/xtCAR fw	65°C	gagaattccaccatgtactctctgtttgaggacgac	EcoR1
xl/xtCAR rv	65°C	gatctagattagaataaaatctctttcatcagaggggtgacg	Xba1
acCAR fw	68°C	gagaattccaccatggccggtctcaccggaaatg	EcoR1
acCAR rv	68°C	gatctagatcagctgatgattcggagagcagtgg	Xba1

2.1.8 Klonierung von CAR-GFP Fusionsproteinen

Für hsCAR sowie xlCARa wurden Fusionsproteine mit dem *green fluorescent protein* (GFP) hergestellt. Die Klonierung erfolgte wie in Abschnitt 2.1.7 beschrieben. Als Template für die PCR wurden die im Abschnitt 2.1.7 hergestellten Expressionsplasmide benutzt. Die kodierende Sequenz der nukleären Rezeptoren wurde in den Vektor pEGFP-C1 (Clontech) subkloniert. Verwendete Primer sowie Restriktionsenzyme sind in Tabelle 2.4 angegeben.

Tabelle 2.4: Primer für die Klonierung von CAR-GFP Fusionsproteinen

Name	Anneal. Temp.	Sequenz	Restriktionsenzym
GFP-C hsCAR fw	65°C	5'-taaactcgagctatggccagtagggaagatgagctg-3'	XhoI
GFP-C hsCAR rv	65°C	5'-gggggaattctcagctgcagatctctctggagcag-3'	EcoRI
GFP-C xlCARa fw	65°C	5'-ggctctcgagctatgtactctttgttgaagacgac-3'	XhoI
GFP-C xlCARa rv	65°C	5'-aactgaattcttagaataagaatctctttcatcagaggggtgac-3'	EcoRI

2.1.9 Klonierung von *Xenopus tropicalis* Cytochrom-P450 Reporterengenkonstrukten

Es wurden drei Luziferase-Reporterengenkonstrukte mit verschiedenen Cytochrom-P450 Promotoren von *Xenopus tropicalis* hergestellt: Cyp3a82 (Länge: 1,4 kb), Cyp3a120 (Länge: 2.9 kb) und Cyp3a121 (Länge: 4 kb). Die Promotorregionen wurden mittels spezifischer Primer (Tabelle 2.5) und PCR aus genomischer DNA amplifiziert. Die PCR-Reaktionen wurden angesetzt wie unter 2.1.7 beschrieben. Für die Amplifikation wurde folgendes Programm benutzt: 2 min initiale Denaturierung bei 98°C gefolgt von 30 Zyklen mit 30 sec Denaturierung bei 98°C, 30 sec Annealing sowie 1:30 min Elongation bei 72°C. Es wurde eine Endelongation für 5 min bei 72°C angeschlossen. Der Restriktionsverdau, die Agarose-Gelelektrophorese mit Gelextraktion sowie die Ligation erfolgten wie unter 2.1.7 beschrieben. Als Vektor wurde der pGL3-basic (Promega) benutzt. Die Transformation sowie DNA-Extraktion erfolgte ebenfalls wie in 2.1.7 beschrieben. Die Subklonierung wurde anhand eines Kontrollverdaus mit HindIII überprüft und anschließend sequenziert (Genterprise, Mainz).

Tabelle 2.5: Primer für die Klonierung der Cyp-Reporterengenkonstrukte von *Xenopus tropicalis*

Name	Anneal. Temp.	Sequenz	Restriktionsenzym
xtCyp3a82 fw	60°C	5'-gcgttaaagcagtggaacagacagac-3'	KpnI
xtCyp3a82 rv	60°C	5'-atgcCTCGAggacaccaggctctcactg-3'	XhoI
xtCyp3a120 fw	60°C	5'-atgcGCTAGccaaggcagtgctgctg-3'	NheI
xtCyp3a120 rv	60°C	5'-atgcCTCGAGcgcttccatgacacactgag-3'	XhoI
xtCyp3a121 fw	60°C	5'-atgcGCTAGCggtcattcacagctgaacctacagag-3'	NheI
xtCyp3a121 rv	60°C	5'-atgcCTCGAGactgtagggcctctcgtg-3'	XhoI

2.1.10 Mutagenese

Die zielgerichtete (site directed) Mutagenese sowie Deletionen in den Plasmidsequenzen wurden mit dem „Quickchange® Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) durchgeführt. Multisite-directed Mutagenese wurde mit dem „Quickchange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Die Primer wurden mit dem Programm „QuickChange Primer Design“ entworfen (<https://www.genomics.agilent.com/CollectionSubpage.aspx?PageType=Tool&SubPageType=ToolQCPD&PageID=15>) und die Mutagenese genau nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die erhaltenen Klone wurden durch Sequenzierung überprüft.

Tabelle 2.6: Primer für die Mutagenese

Template	Name	Sequenz
xlCARa	Leu155Thr fw	5'-agatgaagttggtctccaccctactgaagcgacc-3'
	Leu155Thr rv	5'-ggcgccttcagtgagggtgagaccaacttcatct-3'
	Leu155Glu fw	5'-cagatgaagttggtctccgaactcactgaagcgacctc-3'
	Phe234Ala fw	5'-ggacgacgatttcccgcagctgctgatctcagcact-3'
	Phe234Ala rv	5'-agtgcctgagatcagcagcatcggcaaatcgtcgtcc-3'
	Ile242Val fw	5'-atctcagcacttacatggtccagcaggtcatcca-3'
	Ile242Val rv	5'-tggatgacctgctggaccatgtaagtgtgagat-3'
	Pro253Ser fw	5'-ggcatccaattcgccaaggagattagcgtttccgggctc-3'
	Met272Val fw	5'-cacttctaaaggatcgtccgtcgaggctgccatattcagttc-3'
	Met272Val rv	5'-gaactgaatatggcgacctcgacggacgatctttaagaagt-3'
	Tyr283Phe fw	5'-cagttcaaccgggtctcaacaccgagaccaat-3'
	Tyr283Phe rv	5'-attggtctcgggttgaagaccgggtgaactg-3'
	His295Leu fw	5'-caatctcttgagtggtgaaaacttaattcagcataagagatggtg-3'
	His295Leu rv	5'-caccatctcttatgctgaatttaagtttccacactcaaagagattg-3'
	Lys296Arg fw	5'-caatctcttgagtggtgaaaacatcgattcagcataagagatggtgtata-3'
	Lys296Arg rv	5'-tataacaccatctcttatgctgaatcgatgtttccacactcaaagagattg-3'
	Lys296Leu fw	5'-caatctcttgagtggtgaaaacatctattcagcataagagatggtgtata-3'
	Lys296Leu rv	5'-tataacaccatctcttatgctgaatagatgtttccacactcaaagagattg-3'
	Phe297Tyr fw	5'-ccaatctcttgagtggtgaaaacataaatacagcataagagatggt-3'
	Phe297Tyr rv	5'-accatctcttatgctgtatttatgtttccacactcaaagagattgg-3'
	Thr305Val fw	5'-gaaaacataaattcagcataagagatggtgttatagttgattccaagagatgta-3'
	Thr305Val rv	5'-tacatctcttggatccaactataacaccatctcttatgctgaatttatgttttc-3'
	Tyr311Phe fw	5'-ggattccaagagatgttcttgaaccgggtgatg-3'
	Tyr311Phe rv	5'-catcaccggtccaggaacatctcttggatcc-3'
	Val315Ile fw	5'-ggattccaagagatgttcttgaaccgggtgatg-3'
	Val315Ile rv	5'-catcaccggtccaggaacatctcttggatcc-3'
	Met316Phe fw	5'-gatgtacctggaaccggtgtcaagttcagctcatgttgag-3'
	Met316Phe rv	5'-ctcaacatgagctgaaacttgaaccgggtccaggtacatc-3'
	insAsp+Ile after Gln334 fw	5'-ccagcacatccagatataaggcctgtctgcca-3'
	insAsp+Ile after Gln334 rv	5'-tggcagacaggcctatacctggatgtgctgg-3'
	Ala338Pro fw	5'-cacatccagggcctgtctccatgatgcc-3'
	Ala338Pro rv	5'-ggcatcatgggagacaggccctggatgtg-3'
	Cys339Ala fw	5'-gccttaatagagccttgcctctctcctctgac-3'
	Cys339Ala rv	5'-gtcaggagcgaagaggcgaaggcctctattaaggc-3'
	del Asp408+Ile409 fw	5'-cagatcctcacattcagctctctgaaaacgtcacc-3'
	del Asp408+Ile409 rv	5'-ggcagcttttcagaagactgaatgtgaaggatctg-3'
Ser410Ala fw	5'-atccttcacattcaggatatactctgaaaacgtcacc-3'	
Ser410Ala rv	5'-gggtgacgttttcagaagctatactctgaaatgtgaaggat-3'	
Asp413Pro fw	5'-tcacattcaggatatactctgaaaccgtcaccctctgatg-3'	
Asp413Pro rv	5'-catcagaggggtgacgggttcagaagatatactctgaaatgtga-3'	

Template	Name	Sequenz
hsCAR	Thr116Leu fw	5'-aagagctgatccggctactcctgggggcc-3'
	Thr116Leu rv	5'-gggccccaggagtagccggatcagctctt-3'
	Thr116Glu fw	5'-aagagctgatccgggaactcctgggggcc-3'
	Pro180Ser fw	5'-agttactaaggacctgagcgtctccgtccctgc-3'
	Arg223Lys fw	5'-aaaacttctctgcgggcctcttaatacacaattgaagatggagc-3'
	Arg223Lys rv	5'-gctcatcttcaattgtatttaagagccccagaggaagttt-3'
	Ser337Ala fw	5'-catccagggcctggctgcatgatgcc-3'
	Ser337Ala rv	5'-ggcatcatggcagccagccctggatg-3'

2.1.11 In vitro Proteinexpression und Quantifizierung mittels Western Blot

Die Expressionsstärke und das Molekulargewicht der Proteinprodukte aller Plasmide wurde mit dem TNT[®] T7 Quick Coupled transcription/translation System (Promega) überprüft. Mit dieser Methode wurden funktionelle Proteine nativ zellfrei exprimiert. Für einen Ansatz wurden 10 µl TNT[®] Quick Master Mix, welcher RNA-Polymerase, Nukleotide, Salze, Aminosäuren, Ribonuklease Inhibitor sowie Retikulozytenlysat des Kaninchens enthält, benutzt. Außerdem wurden 0,25 µl Methionin (1mM), 250 ng Plasmid-DNA, 0,5 µl Transcendent[™] Biotin-Lysyl-tRNA sowie Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 12,5 µl zugegeben. Die Plasmide wurden bei 30°C für 90 min exprimiert und die fertigen translatierten und biotinylierten Proteine danach bei -20°C gelagert.

2 µl des Expressionsansatzes wurden mit 10 µl TNT-Ladepuffer (10 mM Tris-HCl mit pH 6,8, 100 mM Dithiothreitol, 2% SDS, 0,1% Bromphenolblau sowie 10% Glycerol) gemischt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die biotinylierten Proteine wurden mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem 4% igem Sammelgel und einem 10% igem Trenngel aufgetrennt. Zum Nachweis der Proteine mit einem semi-dry Blot wurden diese bei 1,5 mA pro cm² Membran für 50 min auf eine Roti®-PVDF-Membran (Roth) übertragen. Die Membran wurde anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur mit 0,05% TBST blockiert und danach über Nacht mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase Konjugat (Cell-Signalling) inkubiert, welches 1 zu 2.000 in 0,05% TBST verdünnt wurde. Am nächsten Tag wurde die Membran zuerst 3 Mal mit 0,05% TBST und danach 3 Mal mit Wasser gewaschen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit der *Enhanced Chemoluminescence*-Methode (ECL-Methode) mit den Femtomax (Rockland) Reagentien. Nach 5 min Inkubationszeit wurde ein Film (Hyperfilm ECL RPN3103K, Amersham Biosciences) aufgelegt und entwickelt. Die Belichtungszeit wurde an die Signalstärke angepasst.

Um die Expression der Deletionsmutante des PXR in Zellen zu überprüfen wurden Westernblot wie beschrieben durchgeführt. Es wurden 75µg Protein aus Zelllysate auf ein Trenngel aufgetragen. Die Membran wurde mit 5%igem Milchpulver blockiert. Zur Detektion wurde der „anti PXR (N-16)“ Antikörper (Katalognummer: SC-9690, Santa Cruz) in einer 1:500 Verdünnung benutzt. Als Zweitantikörper wurde der Peroxidase gekoppelte „anti goat“ Antikörper (Katalognummer: A5420, Sigma) in einer 1:5.000 Verdünnung eingesetzt.

2.1.12 Analyse der intrinsischen Unordnung

Durch die Proteinfaltung erhalten Proteine ihre dreidimensionale Struktur, von der zum Beispiel Protein-Protein Interaktionen, Protein-Liganden Interaktionen aber auch die Evolutionsrate beeinflusst wird. Einige Proteine oder Teile eines Proteins können ungefaltet vorliegen, dies nennt man intrinsisch ungeordnete Proteinstrukturen.

Zur Berechnung der intrinsischen Unordnung wurde der PONDER VL3H Algorithmus (<http://www.ist.temple.edu/disprot/predictor/php>.) nach einem publizierten Protokoll (Krasowski *et al.*, 2008) benutzt. Es wurde jeweils die gesamte Proteinsequenz eingegeben und der längste, zusammenhängende, ungeordnete Proteinabschnitt im Bereich des Indels C-terminal der Helix 3 ausgewertet.

2.1.13 Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurden Zellen in 6-well-Gefäßen mit einem Durchmesser von 9,5 cm² kultiviert. Die Transfektion erfolgte genau wie in Abschnitt 2.1.15 beschrieben. Die Zelllyse erfolgte pro Well mit 300 µl Trypsin bei 37°C und wurde nach drei Minuten mit 2,2 ml phenolrotfreiem Medium abgestoppt. Von diesem Zelllysate wurden 500 µl abgenommen und für eine Reporterengenmessung (Abschnitt 2.1.17) in einem separaten Reaktionsgefäß weiterbehandelt. Das übrige Zelllysate wurde in einem passenden Glasreaktionsgefäß für 5 min bei 500 x g pelletiert und anschließend mit eiskaltem PBS gewaschen. Dieser Vorgang wurde auch mit den Zellen für den Reporterengenassay 2 Mal wiederholt. Für die Durchflusszytometrie werden die Zellen in 500 µl eiskaltem PBS aufgenommen, für den Reporterengenassay in 150µl Passive-Lysis-Puffer (Promega).

Während der Durchflusszytometrie wurden jeweils 100.000 Zellen analysiert und ihre Fluoreszenz mit einem FITC-Filter bei 530 nm detektiert. Benutzt wurde ein BD FACSCalibur Gerät (BD Biosciences) mit „Cell Quest Pro“-Software.

2.1.14 Kultivierung von immortalisierten Zelllinien

Humane Darm-Adenokarzinomzellen, LS174T-Zellen (Tom *et al.*, 1976) sowie die Nierenzelllinie der Grünen Meerkatze, COS-7 (Gluzman, 1981), wurden in 75 cm² Filtertop-Zellkultur-Flaschen gezüchtet. Die Kultivierung erfolgte in 20 ml Kulturmedium bei 37°C, einem CO₂-Gehalt von 8% sowie 95% Luftfeuchtigkeit. Alle verwendeten Zelllinien wurden 2 Mal pro Woche geteilt und passagiert.

Tabelle 2.7: Reagenzien für die Kultivierung von LS174T-Zellen sowie COS7-Zellen

Reagenz	Menge LS174T	Menge COS-7
Medium: „DMSM, high Glucose (4,5 g/l) with L-Glutamine“ (PAA Laboratories GMBH, Pasching)	500 ml	500 ml
Hitze-inaktiviertes fötales Kälberserum (FBS)	50 ml	50 ml
Penicillin (10.000 U/ml), Streptomycin (10 mg/ml)	5 ml	5 ml
Natriumpyruvat (PAA Laboratories GmbH, Pasching)	5 ml	5 ml
1 M HEPES (PAA Laboratories GmbH, Pasching)	10 ml	10 ml
nicht-essentielle Aminosäuren (PAA Laboratories GMBH, Pasching)	5 ml	–

2.1.15 Transfektion

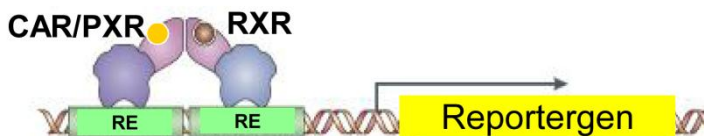


Bild 2.1: Schematische Darstellung eines Reportergenversuches (nach King-Jones and Thummel, 2005)

RE = regulatorisches Element / DNA-Bindestelle, lila = DNA-Bindedomäne, rosa = Ligandenbindedomäne, Kreise = Liganden

Transfektionen für Reportergenversuche (Bild 2.1) wurden entweder in 24-Well oder 96-Well Zellkulturplatten durchgeführt. Es wurden jeweils konstante Zellzahlen 24 Stunden vor der Transfektion in den Zellkulturplatten ausgesät. LS174T-Zellen wurden mit 150.000 Zellen in 500 µl Medium pro Well in einer 24-Well Zellkulturplatte bzw. 25.000 Zellen in 150 µl pro Well in einer 96-Well Zellkulturplatte ausgesät. COS7-Zellen wurden mit 10.000 Zellen in 500 µl pro Well in einer 24-Well Zellkulturplatte bzw. 1.500 Zellen in 150 µl pro Well in einer 96-Well Zellkulturplatte ausgesät.

Die Transfektionen wurden nach Angaben des Herstellers des Transfektionsreagenzes, GeneJuice[®] (Millipore) durchgeführt. Sechs Stunden nach der Transfektion wurde die Induktion durchgeführt. Während der Behandlung mit Induktoren wurden die Zellen in phenolrotfreiem Medium kultiviert. Dieses Induktionsmedium wurde mit Aktivkohle-behandeltem fötalem Kälberserum (FBS) ergänzt. Der Transfektionsansatz erfolgte jeweils

wie in Tabelle 2.8 aufgeführt. Alle Induktionen wurden in Triplikaten gemessen. Vierzig Stunden nach der Behandlung wurden die Zellen mit Passive-Lysis-Puffer (Promega) lysiert. Bei 24-Well Platten wurden 150 μ l benutzt, bei 96-Well Platten waren es 60 μ l.

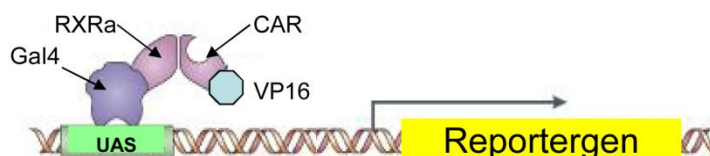
Tabelle 2.8: Transfektionsansatz

Reagenz	Menge/ 24-well	Menge/ 96-well
Medium: „DMSM, high Glucose (4,5 g/l) with L-Glutamine“ (PAA Laboratories GMBH, Pasching)	25 μ l	15 μ l
Expressionsplasmid des nukleären Rezeptors	10 ng	3 ng
Firefly-Reportergenkonstrukt	150 ng	50 ng
Referenzplasmid pRL-EF-1a (Renilla Luziferase)	40 ng	13 ng
entsprechender Leervektor	ad. 200 ng	ad. 66 ng
Transfektionsreagenz (GeneJuice [®] , Millipore, Darmstadt)	1 μ l	0,4 μ l

Tabelle 2.9: Induktoren mit Konzentrationen

Substanz	Konzentration
Androstenol (Sigma)	10 μ M
Artemisinin (Dafra)	100 μ M
Fenofibrat (Sigma)	10 μ M
LCA (Lithocholic acid)(Sigma)	100 μ M
Lovastatin (Sigma)	30 μ M
Phenobarbital	1000 μ M
Pregnandion (5 β -pregnane-3,20-dione)(Sigma)	10 μ M
Pregnenolon (Sigma)	10 μ M
6,16a-Dimethyl Pregnenolon (Sigma)	10 μ M
Progesteron (Sigma)	10 μ M
Rifampicin (Sigma)	10 μ M
SR12813 (Sigma)	10 μ M

2.1.16 Protein Interaktionen mit dem *mammalian-two-hybrid*-System

Bild 2.2: Schematische Darstellung des *Mammalian-two-hybrid*-Versuchssystems (nach King-Jones and Thummel, 2005)

UAS = „upstream activatin sequence“, die Bindestelle für Gal4; lila = DNA-Bindedomäne von Gal4; rosa = die jeweiligen Ligandebindedomänen; hellblau = Aktivierungsdomäne des VP16-Proteins des Herpes-simplex-Virus

Mammalian-two-hybrid-Versuche (Bild 2.2) wurden stets mit COS7-Zellen im 96-Well Format durchgeführt. Transfiziert wurden pro Well 36,67 ng des Reportergenplasmids pGL3-G5 (Arnold *et al.*, 2004), 3,33 ng des Expressionsplasmids, welches entweder für das Fusionsprotein GAL4-DBD/RXR α -LBD (Arnold *et al.*, 2004) oder ein Fusionsprotein GAL4-DBD/Koaktivator-Rezeptorinteraktionsdomäne (Arnold *et al.*, 2004) codierte. Des Weiteren wurden 26,67 ng des Expressionsplasmids, welches für das Fusionsprotein VP16-AD/CAR-LBD (zur Verfügung gestellt von Dr. O. Burk) codiert sowie 7,67 ng des Renilla Luziferase Expressionsplasmids pRL-EF-1a (Bros *et al.*, 2003) transfiziert. Es wurden 0,4 μ l Transfektionsreagenz GeneJuice[®] (Millipore) pro Ansatz benutzt. Für die Induktion wurden Artemisinin, Fenofibrat sowie Pregnandion benutzt. Die Konzentrationen für Artemisinin sowie Fenofibrat waren genau wie im Reportergenassay: Artemisinin (10 μ M) und Fenofibrat (100 μ M). Für Pregnandion wurden vier verschiedene Konzentrationen (3 μ M, 10 μ M, 30 μ M sowie 100 μ M) benutzt. Die Ergebnisse sind jeweils für die Induktion mit 30 μ M Pregnandion dargestellt, da hier der maximale Effekt beobachtet wurde. Die Induktion sowie Zellyse erfolgte genau wie unter 2.1.15 beschrieben.

2.1.17 Reportergenmessung

Die Reportergenmessungen erfolgten wie in (Godtel-Armbrust *et al.*, 2007) beschrieben. Für das 96-Well Format wurden 20 μ l Zellysat für die Messungen benutzt.

2.1.18 Laser-Scanning-Mikroskop (LSM)

Die zelluläre Lokalisation vom humanen sowie *Xenopus*-CAR wurde mit GFP-CAR-Fusionsproteinen (Abschnitt 2.1.8) untersucht.

Die Transfektion erfolgte wie unter Abschnitt 2.1.15 beschrieben, außer dass die Zellen direkt in μ -Slides mit 8 Wells (ibidi) ausgesät wurden und bereits 24h nach der Transfektion untersucht wurden. Die Kernfärbung erfolgte mit Draq5 (Cell Signalling), welches 1:2000 in Hank's Puffer verdünnt wurde und anschließend in einem Volumen von 500 μ l auf die zuvor mit Hank's Puffer gewaschenen Zellen gegeben wurde. Bis zur Aufnahme mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM-710 mit ZEN2009 Software) wurden die Zellen vor Licht geschützt. Angeregt wurden die Zellen jeweils bei 488 nm (GFP) sowie 514 nm (Draq5).

2.2 Tierversuche

2.2.1 Induktion von *Xenopus laevis*

Wildtyp *Xenopus laevis* mit einem Körpergewicht zwischen 32 g und 65 g sowie variablem Alter wurden von Prof. Dr. Markl, Institut für Zoologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz bezogen. Ein Tierversuchsantrag wurde gestellt und am 23. 9. 2010 vom Landesuntersuchungsamt genehmigt (Aktenzeichen 23 177-07/G 10-1-041).

Jeweils drei Frösche wurden für die Dauer des Versuches ca. 72 Stunden in 20-Liter-Aquarien bei einer konstanten Raumtemperatur von 22°C gehalten. Nach einer Akklimatisierung von 24 Stunden wurden die Frösche für drei Minuten in 8°C kaltem Wasser ruhig gestellt. Für die Injektion wurden die Frösche für wenige Sekunden in einem trichterförmigen Plastikschauch fixiert und injiziert. Die Dosis wurde für das durchschnittliche Gewicht der Frösche berechnet. Folgende Dosen wurden intraperitoneal (i.p.) injiziert: Artemisinin: 200 mg/kg in 100 µl DMSO sowie Pregnenolon 50 mg/kg in 100 µl DMSO. Kontrollfrösche wurden mit 100 µl DMSO injiziert. Die Injektion wurde nach 24 Stunden wiederholt. Für die Injektionen wurden Sterican[®]-Kanülen, 0,45 x 12 mm BL/LB, 26G x ½“ von Braun benutzt. 24 Stunden nach der zweiten Injektion wurden die Frösche erneut für 3 Minuten in 8°C kaltem Wasser bewegungsunfähig gemacht und anschließend mit einer Guillotine getötet. Entnommene Organe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80°C gelagert.

2.2.2 Mauszucht

Wildtyp C57BL/6-Mäuse wurden von der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz bezogen. Die Haltung und Zucht erfolgte innerhalb der ZVTE-Räumlichkeiten des Gebäudes 905 der Universitätsmedizin Mainz im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz unter standardisierten Bedingungen. Für die Datenerhebung wurden ausschließlich jungfräuliche Mäuse benutzt - Mäuse mit Nachkommen wurden vom Versuch ausgeschlossen. Ein Tierversuchsantrag für Versuche mit Mäusen wurde gestellt und am 3.9.2012 vom Landesuntersuchungsamt genehmigt (Aktenzeichen 23 177-07/G 12-1-067).

2.2.3 Geschlechtsbestimmung an neugeborenen Mäusen mittels multiplex-PCR

Das Geschlecht der neugeborenen Mäuse wurde anhand des anogenitalen Abstandes ermittelt. Hilfreich war außerdem ein brauner Pigmentfleck bei Männchen an der Stelle, an der später die Hoden einwachsen. Während der Organentnahme bei neugeborenen Mäusen wurde jeweils auch die Schwanzspitze zur Isolierung genomischer DNA entnommen und das Geschlecht mittels multiplex PCR überprüft. Als Positivkontrolle wurden 383 bp von TSH β amplifiziert, einer Untereinheit des *thyroid stimulating hormone*. Nur bei Männchen wurden 249 bp des SRY, dem Y-Chromosom spezifischen *testis-determining factor* amplifiziert (Lavrovsky *et al.*, 1998). Die Reaktion erfolgte in einem 25 μ l Ansatz mit 100 ng genomischer DNA als Template, 2,5 μ l 10x Reactionbuffer S (Peqlab), 0,5 μ l dNTPs (10mM), 0,5 μ l Primergemisch mit 10 mM je Primer (Tabelle 2.10), 0,25 μ l Taq DNA Polymerase (Peqlab) sowie Wasser. Die einzelnen Schritte der PCR wurden wie folgt durchgeführt: 3 min initiale Denaturierung bei 94°C gefolgt von 30 Zyklen mit 1 min Denaturierung bei 94°C, 30 sec Annealing bei 60°C und 20 sec Elongation bei 72°C. Es wurde eine Endelongation bei 72°C für 10 min angeschlossen. 10 μ l des PCR Produkts wurden in einem 2%igen Agarosegel mit 3 μ l Roti-Safe Gelstain (Carl Roth GmbH & Co. KG) pro 100 ml für 60 min bei 80 V aufgetrennt.

Tabelle 2.10: Primer zur Geschlechtsbestimmung bei Mäusen

Name	Sequenz
mouse SRY fw	AGAGATCAGCAAGCAGCTGG
mouse SRY rv	TCTTGCCTGTATGTGATGGC
mouse TSH β fw	AACGGAGAGTGGGTCATCAC
mouse TSH β rv	CATTGGGTAAAGCACACAGG

2.2.4 DNA-Isolierung aus Mäuseschwänzen

Genomische DNA von Mäusen wurde aus Schwanzspitzen isoliert. Zu jeder Schwanzspitze wurden 500 μ l STE-Puffer sowie 25 μ l Proteinase K (20mg/ml) gegeben, kurz gemischt und über Nacht im Wasserbad bei 55°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde für 10 min bei 13.000 UpM und bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml, Eppendorf) überführt und 1 ml kaltes 100% iges Ethanol zugegeben. Beim Invertieren des Reaktionsgefäßes fiel die DNA aus, welche bei 13.000 UpM und 4°C für 20 min pelletiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und zum Waschen wurde 1 ml kaltes 70%iges Ethanol zugegeben. Der letzte Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, der Überstand verworfen und das DNA Pellet wurde für 5-10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die genomische DNA wurde in 50-100 μ l 10 mM Tris pH8 gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 2.11: STE-Puffer

Reagenz	Volumen für 1l
1M Tris pH 8, steril	50 ml
5M NaCl, steril	20 ml
10% SDS, sterilfiltriert	100 ml
0,5M EDTA, steril	2 ml
ddH ₂ O, steril	828 ml

2.2.5 Induktion von Mäusen

Es wurden intraperitoneale Injektionen mit Pregnenolon-16 α -Carbonitril (PCN) sowie 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen (TCPOBOP) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) durchgeführt. Beide Substanzen wurden in einem Gemisch aus 10% DMSO und 90% Maiskeimöl injiziert. Zum Herstellen der Lösungen wurden die Substanzen zunächst in DMSO gelöst und dafür 2 Mal für eine Minute im Wasserbad sonifiziert. Der DMSO-Lösung wurde anschließend das Maiskeimöl zugegeben und stark gemischt. Die Emulsion wurde kurz vor der Injektion nochmals stark geschüttelt und in eine Spritze aufgezogen. Für adulte Mäuse wurden Omnifix[®]-F 1 ml Spritzen (B. Braun) 0,4 x 19 mm Kanülen (B. Braun) benutzt. Neugeborene Mäuse wurden mit 0,5 ml Omnican[®]50 Einmal-Insulinspritzen mit integrierter 0,3 x 8 mm Kanüle (B. Braun) injiziert. Die Dosis betrug jeweils 3 mg/kg für TCPOBOP (Moriya *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2009; Poland *et al.*, 1980) sowie 50 mg/kg PCN (Moriya *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2002; Nem *et al.*, 2012; Moorthy *et al.*, 1997). Für adulte Mäuse entsprach dies einem Volumen von 150 bis 200 μ l, 3 Tage alten Mäusen wurden jeweils Volumina zwischen 15 und 35 μ l injiziert. Die unmittelbare substanzvermittelte Induktion wurde für die TCPOBOP-behandelten Tiere drei Tage nach der Injektion und für die PCN-behandelten Tiere einen Tag nach der Injektion gemessen. Nur mit Lösungsmittel behandelte Kontrolltiere wurden zwei Tage nach der Injektion getötet. Tiere der F₁-Generation wurden im gleichen Alter wie F₀-Tiere getötet: PCN-Nachkommen im Alter von 5 Tagen, DMSO-Nachkommen im Alter von 6 Tagen, TCPOBOP im Alter von 6 Tagen.

2.3 Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 5 (Version 5.04) durchgeführt. Die jeweiligen Tests sind zusammen mit den Ergebnissen beschrieben. Um normal verteilte Daten zu erhalten, wurden die Daten der Reporterassays logarithmisch transformiert.

3 Ergebnisse

3.1 Generationsübergreifende Induktion *in vivo*

Bisher ging man von einer dynamischen Anpassung der Stoffwechsellenzyme nach Aufnahme eines Fremdstoffes aus. Die Xenosensoren CAR und PXR binden viele der verschriebenen Medikamente und regulieren so deren Ausscheidung (Tolson and Wang, 2010). Eine Verlängerung und Vererbung des Induktionsstatus der Zielgene von CAR und PXR könnte relevante Folgen für die Gesundheit der Patienten und sogar deren Kinder haben. Es wurde bereits gezeigt, dass Krankheiten wie Diabetes und Fertilitätsstörungen welche durch Umweltgifte verursacht wurden, an die nächste Generation weitergegeben werden können. Im Folgenden wurde deshalb in Versuchen mit Mäusen untersucht, ob CAR- und PXR-vermittelte Genexpressionsänderungen über die Keimbahn weitergegeben werden. Die Ergebnisse könnten in Zukunft dazu beitragen, die Sicherheit von Medikamenten und das Gefährdungspotential von Umweltgiften genauer einzuschätzen.

3.1.1 Langzeitinduktion in Mäusen nach einmaliger Induktion

In Anlehnung an die Experimente von Chen et al. (Chen *et al.*, 2012) wurden drei Tage alte Mäuse mit dem murinen CAR-Liganden TCPOBOP (1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen) injiziert. Einer weiteren Versuchsgruppe wurde parallel dazu der Ligand des murinen PXR: PCN (Pregnenolon-16alpha-Carbonitril) injiziert, um gleichzeitig die PXR-vermittelten Effekte zu untersuchen. Als Marker für die Induktion des Fremdstoffmetabolismus wurden die von Chen et al. charakterisierten Gene, deren Expression länger als drei Monate induziert blieb (Cyp2b10 und Cyp2c37) gemessen. Da langzeitinduzierte Zielgene von PXR nicht bekannt waren, wurde zusätzlich die Genexpression von Cyp3a11 gemessen, einem gut charakterisierten PXR-Zielgen. Gemessen wurde jeweils die Expression der Enzyme in der Leber. Als Kontrolle wurde zunächst bei einem Teil der Tiere unmittelbar nach Injektion des Liganden die hepatische Genexpression untersucht. Die Expressionsunterschiede wurden jeweils im Vergleich zu einer nur mit dem Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe dargestellt. Am stärksten sind die Genexpressionsunterschiede von Cyp2b10, welches sowohl Zielgen von CAR als auch von PXR ist. Die CAR-vermittelte Induktion ist drei Tage nach der Injektion bei Weibchen 3228-fach und bei Männchen 1558-fach im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe gleichen Geschlechts. Die abgeleiteten Cyp2b10-Genexpressionsänderungen zur jeweils gleichgeschlechtlichen Kontrollgruppe sind in Tabelle 5.2 im Anhang (Seite 102) zusammengefasst. Die PXR-vermittelte Induktion von

Cyp2b10 einen Tag nach PCN-Behandlung ist bei Weibchen 126-fach und bei Männchen 56-fach im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (Bild 3.1 A). Die Effekte auf die Cyp3a11- sowie Cyp2c37-Expression sind schwächer: Die TCPOBOP-vermittelte Zunahme der Cyp3a11-Expression ist bei Weibchen 8-fach und bei Männchen 7-fach. Einen Tag nach der Injektion von PCN ist die Cyp3a11-Expression von Weibchen 12,8-fach und von Männchen 12,4-fach gesteigert. Cyp3a11 ist ebenfalls Zielgen der beiden nukleären Rezeptoren (Cheng *et al.*, 2005; Tojima *et al.*, 2012). Die unmittelbare Genexpressionssteigerung von Cyp2c37 ist durch TCPOBOP bei Weibchen 10-fach und bei Männchen 13-fach erhöht.

Ein anderer Teil der jeweiligen Versuchsgruppen wurde erst drei Monate nach der Injektion getötet, um die langfristigen Folgen einer einmaligen Injektion zu messen. Drei Monate nach Injektion von TCPOBOP konnte eine gesteigerte Genexpression von Cyp2b10 gemessen werden. Bei Weibchen war diese 3,3 Mal stärker, bei Männchen 26,6-fach stärker als bei der Kontrollgruppe des jeweiligen Geschlechts. Die geschlechtsspezifischen Unterschiede werden vor allem durch die gesteigerte basale Aktivität von Cyp2b10 bei Weibchen verursacht. Die Gesamtexpressionsstärke ist bei adulten mit DMSO-behandelten Weibchen höher als bei Männchen (Bild 3.1 B). Für PCN konnte bei keinem der drei untersuchten Gene eine über 2-fache Genexpressionsänderung gemessen werden (Bild 3.1 B, D, F). Darüber hinaus konnte für keinen der beiden Rezeptoren sowie die übrigen Zielgene eine über 2-fache Genexpressionsänderung gemessen werden. Die einzige signifikante Ausnahme ist die 1,6-fache Reduktion der basal erhöhten Genexpression von Cyp3a11 bei Männchen drei Monate nach der Injektion von TCPOBOP (Bild 3.1 D). Die beobachtete Langzeitaktivierung ist demnach nicht genspezifisch, sondern erfordert in diesem Fall eine Kombination aus der entsprechenden Substanz (TCPOBOP) und dem Gen (Cyp2b10).

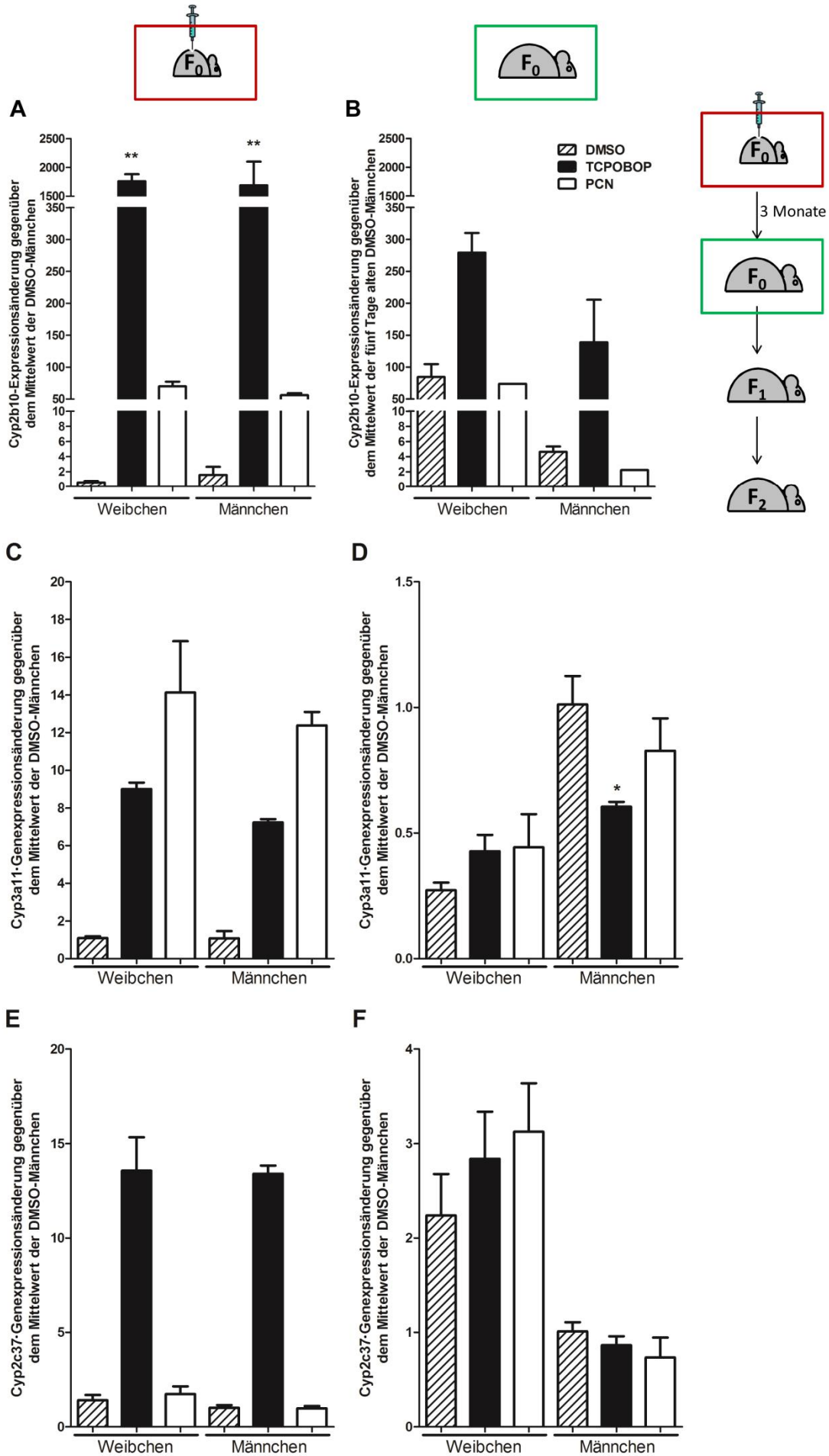


Bild 3.1: Hepatische Genexpression von Cyp-Enzymen im Verlauf von 3 Monaten nach einer Einzelgabe von TCPOBOP oder PCN.

Drei Tage alte Mäuse wurden mit PCN, TCPOBOP oder als Kontrolle mit dem Lösungsmittel (10% DMSO-Maiskeimöl) injiziert. Aus der Leber wurde einen Tag (PCN), drei Tage (TCPOBOP) (A, C, E) oder aus adulten Mäusen drei Monate nach Induktion (B, D, F) die RNA isoliert. Nach reverser Transkription wurde die Genexpression von Cyp2b10 gleichzeitig für (A) und (B) sowie jeweils unabhängig voneinander (C+D) die Cyp3a11-Expression (C+D) und die Cyp2c37-Expression (E+F) mittels Taq-Man PCR und $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode quantifiziert. Die Daten sind als Genexpressionsänderungen im Vergleich zu männlichen, fünf Tage alten Tieren, welche 2 Tage zuvor mit DMSO injiziert wurden, dargestellt (Mittelwert mit Standardfehler). Statistisch signifikante Unterschiede zur jeweiligen DMSO Gruppe wurden mit einfaktorieller Varianzanalyse und Dunnett's Post-hoc-Test ermittelt und mit Sternchen gekennzeichnet (***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$). Die Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe sowie die Standardabweichung sind im Anhang (Tabelle 5.7, Seite 106) dargestellt.

3.1.2 Multigenerationale Vererbung der Enzyminduktion

Um die Weitergabe dieser dauerhaften Genexpressionsänderungen in die nächste Generation zu untersuchen, wurden Mäuse, welche im Alter von 3 Tagen mit TCPOBOP oder PCN behandelt wurden, im Alter von 8 Wochen mit unbehandelten Mäusen verpaart. Die F_1 -Generation wurde im entsprechenden Alter von 4 bis 6 Tagen sowie im Alter von 3 Monaten auf veränderte hepatische Genexpression untersucht. Bei neugeborenen F_1 -Mäusen konnten signifikante über 2-fache Genexpressionsunterschiede nur nach Injektion von TCPOBOP für Cyp2b10 gemessen werden. Die Genexpressionsunterschiede waren ausschließlich bei Nachkommen weiblicher F_1 -Mäuse detektierbar. Weibliche F_1 -Tiere der maternalen Linie zeigten eine 91-fache Induktion und Männchen eine 120-fache Cyp2b10-Induktion (Bild 3.2 A). Da in neugeborenen F_1 -Mäusen nur Genexpressionsunterschiede für Cyp2b10 detektierbar waren, wurde für 3 Monate alte F_1 -Mäuse lediglich die Cyp2b10-Expression untersucht. Nachkommen von weiblichen Tieren, welche mit TCPOBOP injiziert wurden, zeigen im Alter von 3 Monaten ebenfalls eine gesteigerte Expression. Bei Weibchen war die Expression im Vergleich zu Nachkommen der DMSO injizierten Weibchen 2,4-fach erhöht. Bei Männchen war die Expression 7-fach erhöht. Die Gesamtexpression von Cyp2b10 war bei Nachkommen TCPOBOP injizierter Weibchen höher als bei Männchen, welche eine niedrigere Cyp2b10 Basalaktivität hatten (Bild 3.2 B). Eine paternale Weitergabe der Genexpressionssteigerung an die F_1 -Generation wurde nicht gefunden (Bild 3.2).

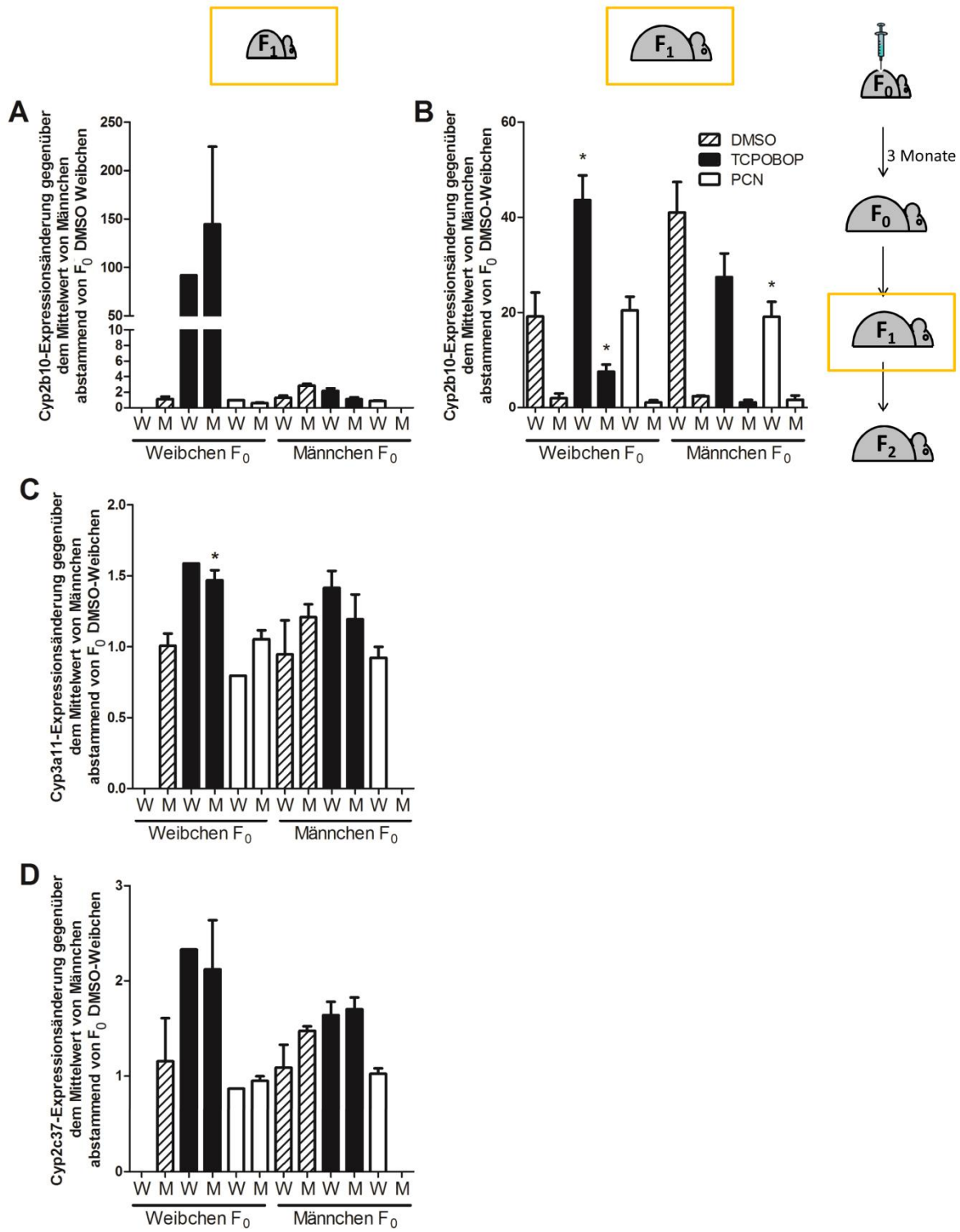


Bild 3.2: Hepatische Genexpression von Cyp-Enzymen in der F₁-Generation im Verlauf von 3 Monaten nach einer Einzelgabe von TCPOBOP oder PCN in der F₀-Generation

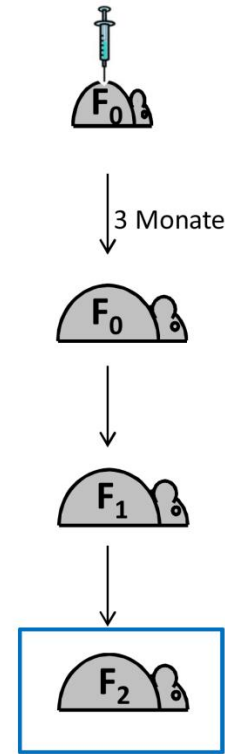
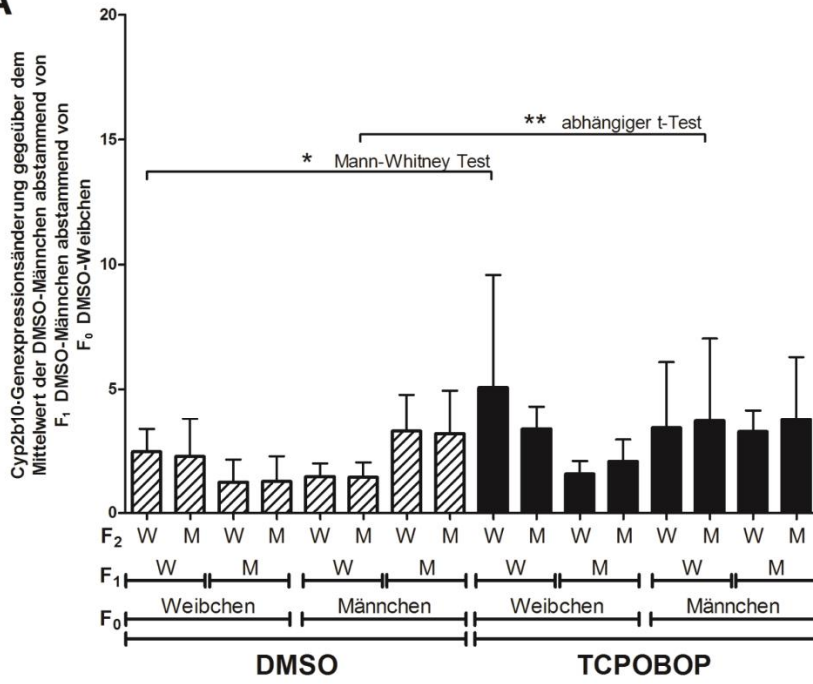
Weibliche sowie männliche 3 Tage alte F₀-Mäuse wurden mit TCPOBOP, PCN oder nur mit Lösungsmittel (10% DMSO-Maiskeimöl) injiziert und im Alter von ca. 8 Wochen mit uninduzierten Tieren verpaart. RNA wurde aus Lebern von 5 Tage alten F₁-Mäusen (A, C, D) sowie drei Monate alten F₁-Mäusen (B) extrahiert. Nach reverser Transkription wurde die Cyp2b10- (A+B), Cyp3a11- (C), Cyp2c37-Expression (D) mittels Taq-Man PCR und $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode quantifiziert. Die Daten sind als Genexpressionsänderungen im Vergleich zu männlichen Nachkommen von weiblichen Mäusen, welche im Alter von drei Tagen mit 10% DMSO-Maiskeimöl injiziert wurden, dargestellt (Mittelwert mit Standardfehler). Statistisch signifikante Unterschiede zur jeweiligen DMSO-Gruppe wurden mit einfaktorierlicher Varianzanalyse und Dunnett's Post-hoc Test ermittelt und mit Sternchen gekennzeichnet (***, P<0,001; **, P<0,01; *, P<0,05). A wurde wegen zu kleiner Tierzahlen statistisch nicht ausgewertet. Für B wurden jeweils Kruskal Wallis-Tests durchgeführt. Für C und D wurden Dunnett-Post-hoc-Tests für männliche Nachkommen von F₀-Weibchen sowie weibliche Nachkommen von F₀-Männchen durchgeführt. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe sowie die Standardabweichung sind im Anhang (Tabelle 5.7, Seite 106) dargestellt.

3.1.3 Transgenerationale Vererbung der Enzyminduktion

Für die Untersuchung der transgenerationalen Vererbung wurden F₁-Mäuse wiederum mit unbehandelten Tieren verpaart. Mittels qPCR wurden aufgrund exponentiell ansteigender Versuchsgruppen nur Nachkommen von DMSO- bzw. TCPOBOP-behandelten F₀-Tieren auf veränderte Cyp2b10-Expression untersucht. Weder bei 5 bis 6 Tage alten Tieren (Bild 3.3 A) noch bei Adulttieren (Bild 3.3 B) konnte eine über 2-fache Genexpressionsänderung detektiert werden. F₂-Nachkommen TCPOBOP oder PCN induzierter Tiere zeigten im Vergleich zu Nachkommen DMSO induzierter Tiere auch keine signifikanten Änderungen im Körpergewicht, Lebergewicht oder im Verhältnis dieser beiden Werte. Die generationsübergreifenden Genexpressionsänderungen von Cyp2b10 werden demnach multigenerational über die maternale Linie weitergegeben.

Trotz ausbleibender Cyp2b10-Genexpressionsunterschiede in F₂-Nachkommen TCPOBOP-behandelter Mäuse, könnten die F₂-Mäuse sensibler auf eine erneute Injektion mit TCPOBOP reagieren. Um die Sensibilität der F₂-Mäuse auf TCPOBOP zu überprüfen, wurde die Hälfte der F₂-Adulttiere im Alter von 3 Monaten erneut mit TCPOBOP-behandelt. Um Genexpressionsunterschiede besser detektieren zu können und nicht den maximalen Effekt durch eine direkte Induktion hervorzurufen, wurde eine 5-fach geringere Dosis von TCPOBOP gewählt: 0,6 mg/kg. Bei diesem Experiment konnten ebenfalls keine Unterschiede in der Cyp2b10-Genexpression zwischen Nachkommen DMSO-behandelter Tieren und Nachkommen TCPOBOP-behandelter Tiere gemessen werden. (Die Taq-Man Versuche zu den Adulttieren wurden von K. Dietrich im Verlauf ihrer Doktorarbeit durchgeführt). Die erneut mit TCPOBOP induzierten F₂-Nachkommen DMSO-behandelter oder TCPOBOP-behandelter F₀-Mäuse unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant im Körpergewicht, Lebergewicht oder im Verhältnis dieser beiden Werte.

A



B

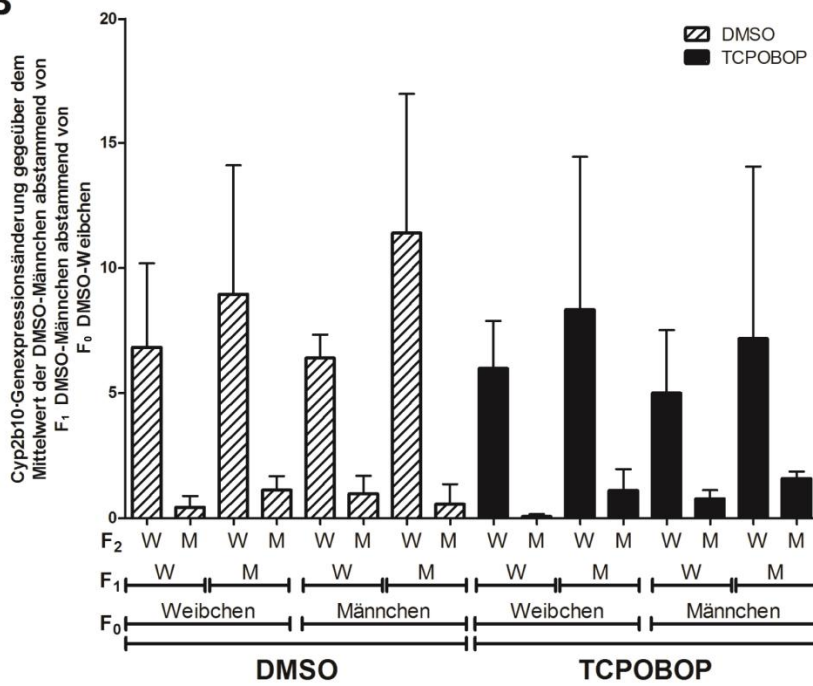


Bild 3.3: Hepatische Genexpression von Cyp2b10 in der F₂-Generation im Verlauf von 3 Monaten nach einer Einzelgabe von TCPOBOP in der F₀-Generation

Neugeborene F₀-Mäuse wurden 3 Tage nach der Geburt mit TCPOBOP oder als Kontrolle mit Lösungsmittel (10% DMSO-Maiskeimöl) behandelt. Diese F₀-Generation wurde zwei Mal mit unbehandelten Mäusen verpaart um eine F₂-Generation zu erhalten. RNA wurde aus Lebern von 6 Tage alten F₁-Mäusen (A) sowie drei Monate alten F₁-Mäusen (B) extrahiert. Nach reverser Transkription wurde die Cyp2b10-Genexpression mittels Taq-Man PCR und $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode quantifiziert. Die Daten sind als Genexpressionsänderungen im Vergleich zu männlichen Nachkommen männlicher F₁-Tiere abstammend von weiblichen F₀-Mäusen, welche im Alter von drei Tagen mit 10% DMSO-Maiskeimöl injiziert wurden, dargestellt (Mittelwert mit Standardfehler). Statistisch signifikante Unterschiede zur jeweiligen DMSO-Gruppe wurden mit t-Tests bzw. Mann Whitney-Tests ermittelt und mit Sternchen gekennzeichnet (**, P<0,01; *, P<0,05). Die Anzahl der Tiere pro Gruppe sowie die Standardabweichung sind im Anhang (Tabelle 5.7, Seite 106) dargestellt.

3.1.4 Generationsübergreifende Enzyminduktion nach Injektion von Adulttieren

Bisher wurden die dauerhafte Enzyminduktion sowie deren multigenerationale Weitergabe an die F₁-Generation nur nach Induktion von neugeborenen Mäusen gezeigt. Erwachsene haben im Allgemeinen im Laufe ihres Lebens mehr Kontakt zu Fremdstoffen als Neugeborene. Eine Induktion nach präkonzeptioneller Injektion von Adulttieren wäre deswegen potentiell von besonderer klinischer Relevanz. Analog zu den Versuchen an neugeborenen Mäusen wurden erwachsene Mäuse mit einer Dosis von ebenfalls 3mg/kg TCPOBOP oder 50mg/kg PCN injiziert. Die direkte hepatische Cyp2b10-Induktion wurde wiederum 3 Tage nach TCPOBOP-Injektion bzw. einen Tag nach PCN-Injektion gemessen. Die Kontrolltiere wurden 2 Tage nach der Injektion des Lösungsmittels getötet. Die unmittelbare Cyp2b10-Induktion betrug bei Weibchen das 177-fache nach TCPOBOP-Injektion sowie das 4,7-fache nach PCN-Injektion. Männchen hatten nach TCPOBOP-Injektion eine 5615-fach gesteigerte Cyp2b10-Expression sowie nach PCN-Injektion eine 12-fach gesteigerte Expression gegenüber der DMSO-Kontrolle (Bild 3.4 A). Sechs Wochen nach der Induktion von Adulttieren konnte ebenfalls eine dauerhaft gesteigerte Cyp2b10-Expression nach TCPOBOP-Injektion gemessen werden. Bei Weibchen war sie 40 Mal so hoch wie die der DMSO-Kontrolle, bei Männchen 298 Mal so hoch. Eine Langzeitinduktion über 6 Wochen konnte nach PCN-Gabe nicht detektiert werden (Bild 3.4 B).

Die Transmission der veränderten Enzymexpression in die nächste Generation wurde an TCPOBOP-behandelten Weibchen getestet, welche mit unbehandelten Männchen verpaart wurden. Die hepatische Cyp2b10-Expression wurde 6 Tage nach der Geburt untersucht. Für F₁-Weibchen wurde eine 748-fache Induktion, für Männchen eine 539-fache Induktion gegenüber der jeweiligen Lösungsmittel-Kontrolle gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Injektion von adulten Tieren mit TCPOBOP ebenfalls einen dauerhaften und generationsübergreifenden Einfluss auf die hepatische Enzymexpression hat.

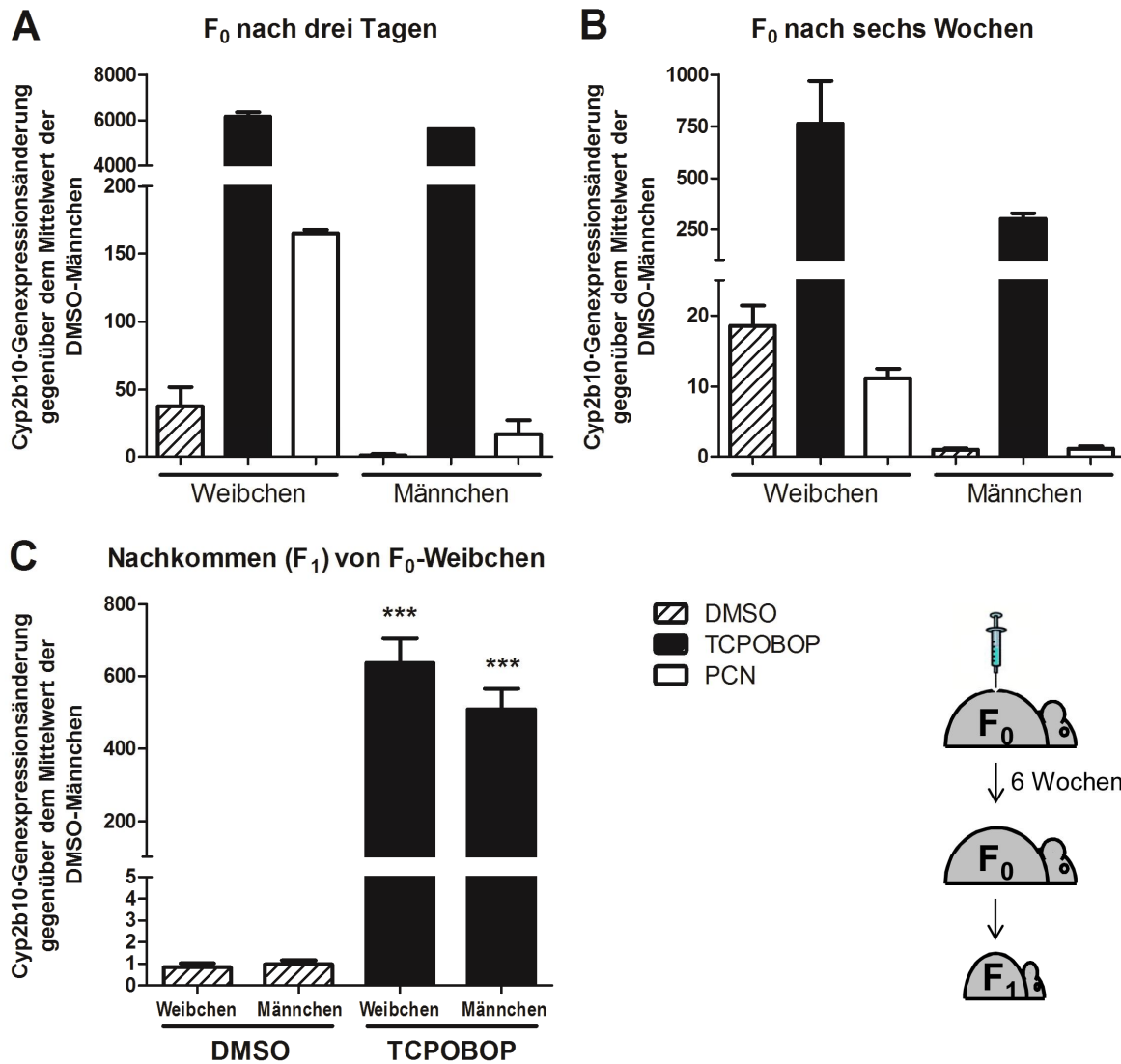


Bild 3.4: Langzeitinduktion sowie multigenerationaler Transfer der Cyp2b10-Expression nach Injektion von weiblichen Adulttieren

Unmittelbare Induktion nach einem Tag (PCN) bzw. nach drei Tagen (TCPOBOP) (A) sowie Langzeitinduktion der Cyp2b10-Expression nach sechs Wochen in adulten Weibchen (B) sowie Cyp2b10-Expression von sechs Tage alten Nachkommen (F_1) weiblicher mit DMSO oder TCPOBOP injizierter F_0 -Tiere (C). Nach der RNA-Extraktion aus der Leber sowie reverser Transkription wurde die Cyp2b10-Expression mittels Taq-Man PCR und $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode quantifiziert. Die Daten sind als Genexpressionsänderungen von Cyp2b10 im Vergleich zum Mittelwert der männlichen DMSO Tieren dargestellt. (Mittelwert und Standardfehler). Für (A) sowie (B) wurden wegen einer Tierzahl von zwei Tieren pro Gruppe keine statistischen Analysen durchgeführt. (C) Statistisch signifikante Unterschiede zur jeweiligen DMSO-Gruppe wurden im t-Test ermittelt und mit Sternchen gekennzeichnet (***, $P < 0,001$) $n=5-10$. Genaue Angaben zur Anzahl der Tiere pro Gruppe sowie die Standardabweichung sind im Anhang (Tabelle 5.8, Seite 107) dargestellt.

3.1.5 Der genomweite Umfang der dauerhaften sowie generationsübergreifenden Veränderungen nach einmaligem Fremdstoffkontakt in der F₀-Generation

Die dauerhaften Veränderungen in der Genexpression nach einmaliger TCPOBOP Exposition wurde von Chen et al. (Chen *et al.*, 2012) innerhalb der F₀-Generation für 2 von 21 untersuchten Gene gezeigt (Cyp2b10 sowie Cyp2c37). Die PXR-vermittelten Langzeitveränderungen in der Genexpression, sowie generationsübergreifende Auswirkungen wurden erst in der vorliegenden Arbeit gezeigt. Um das vollständige Ausmaß der Genexpressionsveränderungen zu erfassen, wurde das gesamte Transkriptom mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung bestimmt. Es wurden Leber-RNA Proben jeweils männlicher 4 bis 6 Tage alter Neugeborener sowie 3 Monate alter Adulttiere der F₀- und der F₁-Generation analysiert. Für die F₁-Generation wurden nur männliche Nachkommen induzierter Weibchen sequenziert. Die meisten Genexpressionsveränderungen wurden unmittelbar, das heißt 3 Tage nach TCPOBOP-Injektion bzw. 24h nach PCN-Injektion detektiert (Bild 3.5). Direkt nach TCPOBOP-Injektion war in 6 Tage alten Tieren bei 399 Genen die Expressionsstärke mindestens 2,2-fach gegenüber der Lösungsmittelkontrolle verändert. Bei 4 Tage alten PCN-induzierten Tieren sind etwa 2,5 Mal so viele Gene differentiell exprimiert: 994. Nach TCPOBOP-Induktion ist die Anzahl der differentiell exprimierten Gene direkt nach der Induktion sowie drei Monate später (329 Gene) ähnlich. Die neugeborenen Tiere der F₁-Generation unterscheiden sich ebenfalls nur gering in der Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene (329 Gene). Die Adulttiere der F₁-Generation weichen hingegen mit nur etwa einem Viertel der Anzahl an differentiell regulierten Gene (93) ab. Nach der PCN-Induktion nehmen hingegen die differentiell exprimierten Gene im Zeitverlauf kontinuierlich ab. Während direkt nach der Induktion 994 Gene differentiell exprimiert waren, waren 3 Monate später nur noch 306 Gene unterschiedlich stark exprimiert. In der F₁-Generation waren bei Neugeborenen 201 Gene differentiell exprimiert, drei Monate später noch 147 Gene. In der TCPOBOP-Versuchsgruppe überwiegen leicht die Gene mit gesteigerter Expression, in der PCN-Gruppe ist das Verhältnis zwischen induzierten und reprimierten Genen ähnlich. Direkt nach der Induktion von neugeborenen Mäusen ist der Anteil der gemeinsam regulierten Gene zwischen der TCPOBOP- und der PCN-Gruppe am größten (183 Gene), es überlappten 85% der durch TCPOBOP differentiell regulierten Gene mit der PCN-Gruppe. In der F₁-Generation überlappen noch etwa ein Drittel der differentiell regulierten Gene. Bei Adulttieren überlappen 3 Monate nach der Induktion 118 regulierte Gene. In der F₁-Generation überlappen noch etwa ein Viertel der differentiell exprimierten Gene (Bild 5.1 im Anhang).

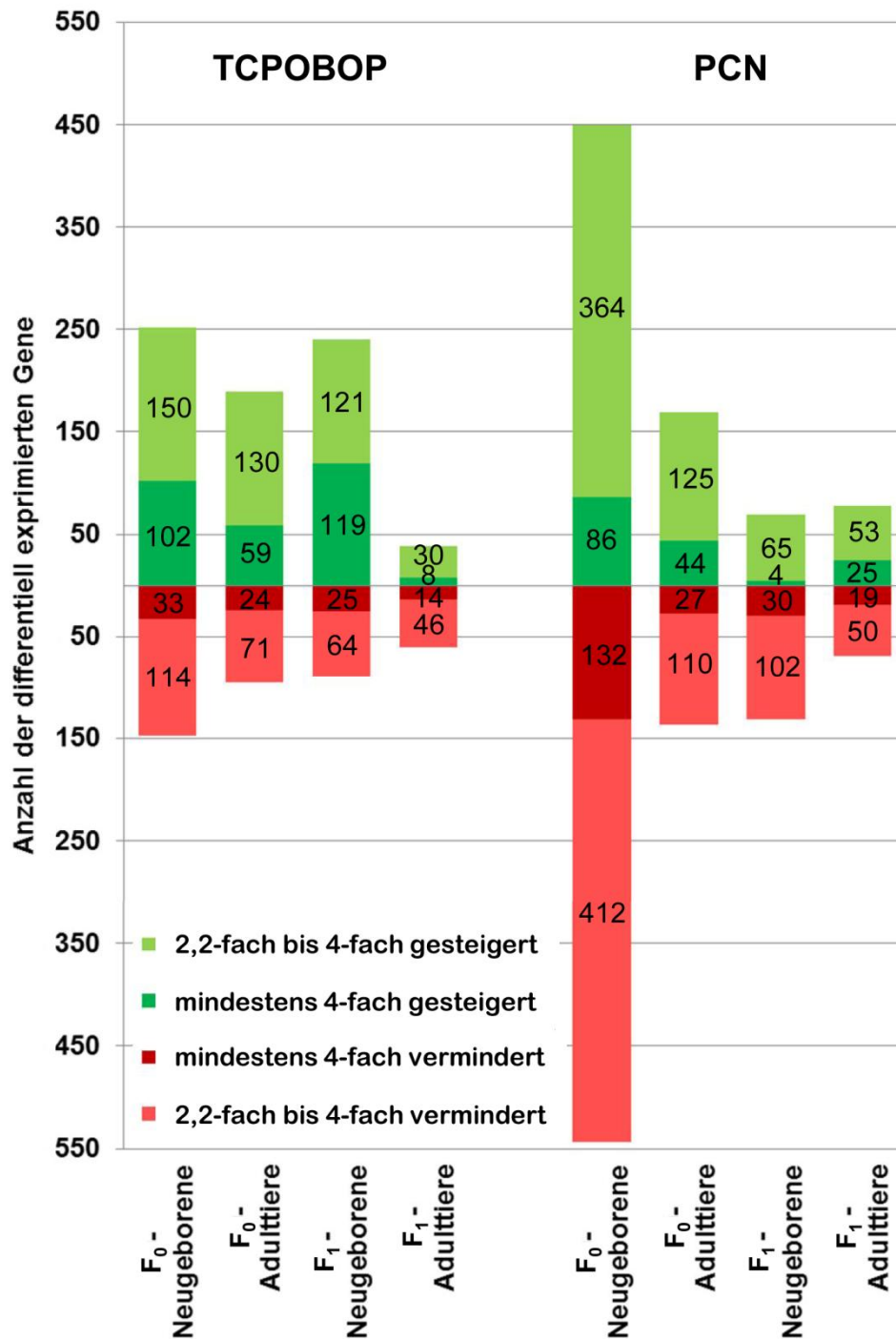


Bild 3.5: Anzahl der direkt, langfristig und generationsübergreifend differentiell exprimierten Gene nach TCPOBOP bzw. PCN Induktion

Die differentiell exprimierten Gene wurden mittels RNA-Hochdurchsatz-Sequenzierung ermittelt. Die Anzahl der Gene mit gesteigerter Expression gegenüber der Lösungsmittelkontrolle sind in Grün dargestellt, die Anzahl der Gene mit verminderter Genexpression sind in Rot dargestellt.

Die dauerhafte Induktion der Cyp2b10-Expression nach einmaliger neonataler TCPOBOP Injektion der F₀-Generation konnte mit der Hochdurchsatz-Sequenzierung bestätigt werden (Tabelle 3.1). Unterstützt werden die Ergebnisse durch robuste FPKM-Werte für Cyp2b10. In der 6 Tage alten F₀-Generation steigen die FPKM von 0,68 auf 1471,75 (Tabelle 3.1).

Im Vergleich dazu liegt der FPKM des Haushaltsgens Gapdh in jeder Versuchsgruppe bei ungefähr 900.

Tabelle 3.1: FPKM-Werte sowie Genexpressionsänderungen von Cyp2b10 in F₀- und F₁-Männchen

	FPKM DMSO	FPKM TCPOBOP	Genexpressions- änderung *	Genexpressions- änderung (qPCR)*
F ₀ -Neugeborene	0,68	1471,75	2150-fach	1558-fach
F ₀ -Adulttiere	2,3	66,9	29-fach	27-fach
F ₁ -Neugeborene	0,44	69,9	156-fach	120-fach
F ₁ -Adulttiere	1,3	6,03	5-fach	7-fach

* Genexpressionsänderungen bei F₀-Männchen und männlichen Nachkommen von F₀-Weibchen im Vergleich zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle. Die mittels qPCR bestimmten Genexpressionsänderungen sind zum direkten Vergleich den Ergebnissteilen 3.1.1 sowie 3.1.2 entnommen.

Neben Cyp2b10 wurden keine anderen Gene mit signifikant erhöhter Genexpression über die Versuchsgruppen hinweg detektiert. Das Gen Nebl, welches für das Muskelprotein Nebulette codiert, zeigte 3 Tage nach TCPOBOP-Injektion eine 65-fache Genexpression, drei Monate später ist es immer noch 24-fach induziert. In der F₁-Generation ist es bei Neugeborenen 6,4-fach induziert, bei adulten F₁-Tieren noch 2,3-fach. Die Anzahl der sequenzierten Fragmente ist für Nebl allerdings bis auf bei neugeborenen F₀-Mäusen sehr niedrig, sodass diese Werte nicht als robust eingeschätzt werden können.

Bei PCN wurde das Gen Fxyd7 als dauerhaft 3- bis 5-fach reprimiertes Gen identifiziert, auch hier sind allerdings ebenfalls zu wenige sequenzierte Fragmente bei Adulttieren vorhanden.

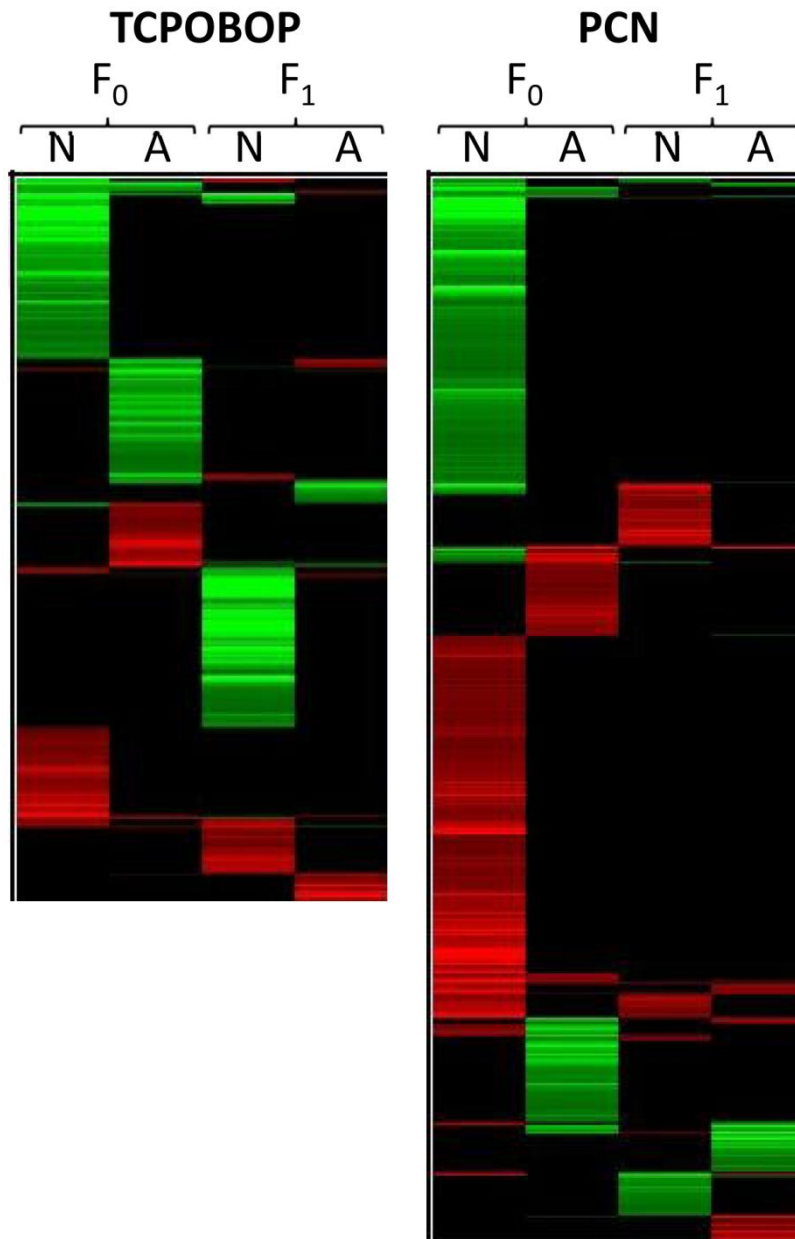


Bild 3.6: Heatmap der differentiell exprimierten Gene bei F₀- sowie F₁-Tieren nach einmaliger TCPOBOP- oder PCN-Injektion in der F₀-Generation

Die differentiell exprimierten Gene wurden mit einer hierarchischen Clusteranalyse (*centroid linkage*) mit dem Programm „cluster 3.0“ gruppiert. Mit „Java Treeview“ wurden entlang der x-Achse die Gene und entlang der y-Achse die Proben dargestellt. N=3 Tage alte Tiere, A=Adulttiere. Gene mit gesteigerter Expression im Vergleich zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle sind grün und reprimierte Gene im Vergleich zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle sind rot dargestellt.

Die im Vergleich zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle induzierten oder reprimierten Gene überlappen zwischen den Versuchsgruppen kaum. Mit der Ausnahme von Cyp2b10 betreffen die differentiell exprimierten Gene jeweils komplett unterschiedliche Sätze von Genen (Bild 3.6). Allerdings überlappen einige durch die Genexpressionsänderungen beeinflussten Signalwege zwischen den Gruppen. In einer Top 15-Liste (Tabelle 5.5 im Anhang) der hoch sowie herunter regulierten Gene aller Gruppen, finden sich einige Gene, deren Proteinprodukte eine Rolle im Fremdstoffmetabolismus sowie Energiemetabolismus

haben. Eine gezielte Literaturrecherche in der Datenbank Pubmed ergab dauerhafte Änderungen nach TCPOBOP hauptsächlich im Fremdstoffmetabolismus. Nach PCN-Injektion entstanden eher multigenerationale Änderungen des Energiemetabolismus.









TCPOBOP				PCN			
F ₀		F ₁		F ₀		F ₁	
							
Cyp2c Cyp2b10 Sult1e1 Neb1 Cyp26a1	Sult1e1 Cyp2b10 Neb1	Amd1/2 Cyp2b10 Cyp2c Dio2 Neb1	Ugt2a1 Cyp2b10 Neb1	Cyp2c Cyp2b10		Dio2 Sult6b1 Fmd3 Ptpq Neb1	Saa3
Amd1/2 Cyp4f39	Cyp4a14 Cyp4f39	Cyp1a1 Cyp3a41b	Ugt2a2 Cyp2b9 Mup5 Cyp2c69 Cyp2c40		Amd1/2	Paqr5 Cyp4a12b Cyp3a41b	Amd1/2 Mup5 Cyp2d12 Cyp2b9 Cyp2c69 Cyp2c40

Bild 3.7: Analyse der differentiell exprimierten Gene mit einer Rolle im Fremdstoffmetabolismus oder Energiemetabolismus

Literaturrecherche in der Datenbank Pubmed zu den je 15 am stärksten differentiell regulierten Genen. Grau hinterlegt sind die hochregulierten Gene, weiß die herunterregulierten. Die Schriftgrößen geben die ungefähre Stärke der Genexpressionsänderungen im Vergleich zu Lösungsmittelkontrolle wieder. Unterstrichen sind Gene mit Genexpressionsänderungen in jeweils allen 4 Versuchsgruppen. Die beiden thematischen Gebiete Fremdstoffmetabolismus (blau) sowie Energiemetabolismus (grün) sind ebenfalls voneinander abgegrenzt.

Eine allgemeine Analyse der unterschiedlich regulierten Signalwege wurde auch mit dem Programm Ingenuity durchgeführt, vereinzelt wurden das Programm DAVID sowie ergänzend die Literaturdatenbank Pubmed einbezogen. Es wurden jeweils Signalwege, Funktionen oder assoziierte Krankheiten berücksichtigt, welche entsprechend einer Funktion in der Leber den höchsten Signifikanzwert hatten. Nach TCPOBOP-Exposition wurde differentielle Regulation vor allem im Bereich des Fremdstoffmetabolismus identifiziert. Es konnten aber auch andere Funktionen, welche sich von endogenen CAR-Funktionen ableiten, detektiert werden: der Lipidstoffwechsel (Neugeborene: Npc111, Aldh1a1; Adulttiere: Cyp4a14, Sult1e1) bei Tieren der F₀-Generation oder Immunkrankheiten (Cd40, Ccl8) bei adulten F₁-Tieren (Bild 3.8).

Bei PCN gehören in der F₀-Generation die unterschiedlich regulierten Signalwege zum Fremdstoff- (Cyp2c55, Cyp2b10, Cyp3a11) sowie Lipidstoffwechsel (Saa1, Baat, Cyp4a14). In der F₁-Generation kam es zu Beeinträchtigungen von Genen mit Produkten, welche im Energiestoffwechsel sowie bei Stoffwechselkrankheiten eine Rolle spielen (Bild 3.7.). In den neugeborenen F₀-Mäusen wurden Gene, welche bei Krebs (Nnm1, Birk5, Bhmt) differentiell exprimiert sind, reguliert. Bei adulten Mäusen der F₁-Generation waren Gene unterschiedlich reguliert, deren Produkt bei Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen (Tlr2, Il1r1, Nfkb2) (Bild 3.8).









TCPOBOP				PCN			
F ₀		F ₁		F ₀		F ₁	
							
Lipid-stoffwechsel	Lipid-stoffwechsel		Lipid -/ Fettsäure- stoffwechsel	Lipid-stoffwechsel			
						Stoffwechsel- krankheit, Kohlehydrat- stoffwechsel	<i>Stoffwechsel- krankheit, Glukose- toleranz</i>
Medikamenten- stoffwechsel		Medikamenten- stoffwechsel				<i>Medikamenten- stoffwechsel</i>	
	Leber- proliferation				Lebernekrose	Lebernekrose	Leber- schädigungen
PXR+ CAR/RXR Aktivierung	LPS/IL-1 vermittelte Inhibition der RXR Funktion	CAR/RXR Aktivierung	Cytochrom P450-Enzyme	PXR/RXR Aktivierung			Cytochrom P450-Enzyme, LXR/RXR Aktivierung
			Immun- krankheit	Krebs			Entzündungs- reaktionen

Bild 3.8: Analyse der differentiell regulierten Signalwege

Differentiell regulierte Signalwege wurden hauptsächlich mit dem Programm Ingenuity ermittelt. Es wurden jeweils die signifikantesten Signalwege und Funktionen ausgewählt. Wenn die signifikantesten Signalwege spezifisch für ein anderes Organ waren, wurden die nächstsignifikanten Signalwege (bis Position 4) gewählt. Kursiv gedruckte Signalwege wurden mit dem Programm DAVID oder mit der Pubmed-Literaturrecherche ermittelt.

3.2 Evolutionäre Anpassung

Eine andere zeitliche Dimension nehmen evolutionäre Veränderungen der nukleären Rezeptoren ein. Hierunter werden stabile Veränderungen der Genomsequenz im Verlauf der Zeit betrachtet. Hierbei spielen ebenfalls Anpassungen an den jeweiligen Lebensraum einer Tierart eine Rolle. In diesem Kapitel wird die Aktivität sowie die Funktion des CAR bei Amphibien beschrieben um detaillierte Erkenntnisse über den humanen Rezeptor ableiten zu können.

3.2.1 Klonierung und Expression von CAR von Nichtsäugetierarten

Um die proteinkodierenden cDNA-Abschnitte der orthologen Nichtsäugetier-CAR-Gene der Leber zu amplifizieren, wurden PCR-Primer anhand der genomischen Sequenz von *Anolis carolinensis* und *Xenopus tropicalis* hergestellt. Da keine genomische Sequenz für *Xenopus laevis* verfügbar war, wurden die gleichen Primer wie für *Xenopus tropicalis* benutzt. Durch die für *Xenopus tropicalis* spezifischen Primer wurden am 5'-und 3'-Ende der *Xenopus laevis* Sequenz Mutationen eingefügt. Um Genkopien sowie häufige CAR-Splice-Varianten zu finden, wurden 20 Subklone von *Anolis carolinensis*, 17 Subklone von *Xenopus laevis* und 18 Subklone von *Xenopus tropicalis* sequenziert. Passend zu dem tetraploiden Genom von *Xenopus laevis* wurden zwei cDNA-Sequenzen: xlCARa und xlCARb amplifiziert. 15 der 17 CAR-Subklone aus *Xenopus laevis*-Leber waren xlCARa Subklone, 2 xlCARb. Außerdem wurde bei einem der 15 xlCARa Subklone ein 25 bp langes Insert zwischen Exon 8 und Exon 9 gefunden. Unter den *Xenopus tropicalis* CAR-Subklonen befand sich keine Variante. Zwei *Anolis carolinensis*-Subklone hatten 4 bp lange Deletionen in Exon 7.

Die cDNA-CAR-Sequenzen von *Xenopus laevis*, *Xenopus tropicalis* sowie *Anolis carolinensis* wurden in der Datenbank des NCBI deponiert. Die Accessionnummern sind in (Tabelle 3.2) angegeben.

Tabelle 3.2: Accessionnummern der cDNA-CAR-Sequenzen von *Anolis carolinensis*, *Xenopus tropicalis* sowie *Xenopus laevis*

nukleärer Rezeptor	Art	Accessionnummer
CAR	<i>Anolis carolinensis</i>	HM117647
CAR	<i>Xenopus tropicalis</i>	HM117646
CARa	<i>Xenopus laevis</i>	HM117645
CARb	<i>Xenopus laevis</i>	HM117644

Im Vergleich sind orthologe CAR-Proteinsequenzen bei Säugetieren kürzer als bei Nichtsäugetieren. Die durch die CAR Gene codierte Proteinsequenz beträgt beim menschlichen CAR 348 Aminosäuren (AS), bei acCAR sind es 403 AS, bei *Xenopus tropicalis* 425 AS und bei *Xenopus laevis* sind es 423 AS bei xlCARa bzw. 420 AS bei xlCARb (Bild 3.9). Die Längenunterschiede ergeben sich hauptsächlich aus einer längeren N-Terminalen Sequenz sowie einer interhelicalen Domäne zwischen Helix 1 und Helix 3 bei Nichtsäugetieren. Diese interhelikalen Domänen stimmen von der Lokalisation im Protein mit den bei PXR und VDR gefundenen überein, die Länge sowie Sequenz sind im Gegensatz dazu nicht konserviert.

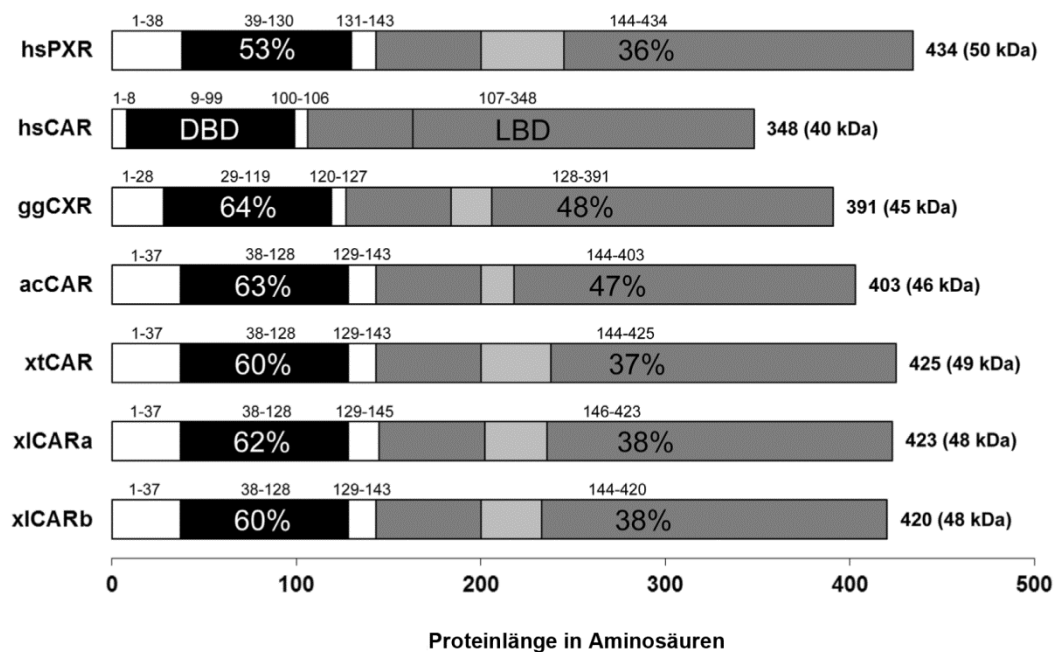


Bild 3.9: Struktur sowie Aminosäuresequenzvergleich von humanem PXR und CAR mit Nichtsäugetier-CAR

Mit Bioedit (Hall, 1999) wurde eine *Sequence Identity Matrix* erstellt. Die Aminosäureübereinstimmungen des humanen PXR sowie des CAR der Nichtsäugetiere im Vergleich zum humanen CAR wurden für die DNA- (DBD) und Ligandenbindedomäne (LBD) separat berechnet. Der interhelikale Bereich C-terminal der Helix 3 ist hellgrau hinterlegt. Die Zahlen auf der rechten Seite geben die Anzahl der Aminosäuren sowie das berechnete Molekulargewicht an. Mensch (*Homo sapiens*, hs), Huhn (*Gallus gallus*, gg), Eidechse (*Anolis carolinensis*, ac), Krallenfrösche (*Xenopus laevis*, xl und *Xenopus tropicalis*, xt)

3.2.2 Expression der Nichtsäugetier-CAR-Gene

Durch die Expressionsstärke eines Proteins kann seine Effektstärke verändert werden. Da die Funktion der nukleären Rezeptoren verschiedener Arten verglichen werden sollte, wurde zunächst ihre Expressionsstärke untersucht. *In vitro* transkribierte und translatierte CAR-Proteine des Menschen, von *Anolis carolinensis*, *Xenopus tropicalis* sowie beide CAR-Proteine von *Xenopus laevis* zeigten die gleiche Expressionsstärke. Dies konnte von Dr. O. Burk mit dem „TNT T7 Quick Coupled transcription/translation system“ (Promega) mit Hilfe von [³⁵S]-markierten Proteinen und anschließendem Westernblot gezeigt werden (Mathäs *et al.*, 2012). GFP-Fusionsproteine von hsCAR und xlCAR wurden auch hinsichtlich ihrer Expressionsstärke nach transienter Transfektion in COS7-Zellen überprüft. Die Transfektion wurde in 6-well Zellkulturschalen mit zwei verschiedenen Mengen durchgeführt: 50 ng/Well sowie 2000 ng/Well Plasmid-DNA des Fusionsproteins. Die Transfektionseffizienz wurde durch Co-Transfektion der Renilla-Luziferase und anschließender Luziferase-Aktivitätsmessung am Luminometer überprüft. Mittels Durchflusszytometrie wurden jeweils 100.000 Zellen analysiert. Die Intensität der Fluoreszenz war bei einer Transfektion mit 50 ng/Well für xlCAR etwas niedriger, bei höheren Mengen gleich (Bild 3.10). Die Expressionsstärke der beiden nukleären Rezeptoren ist also im Zellmodell nach transienter Transfektion ähnlich. Von Kristin Römer wurde vorangehend überprüft und sichergestellt, dass die Funktion des Fusionsproteins sich in der Zellkultur nicht von der des nativen Rezeptors unterscheidet.

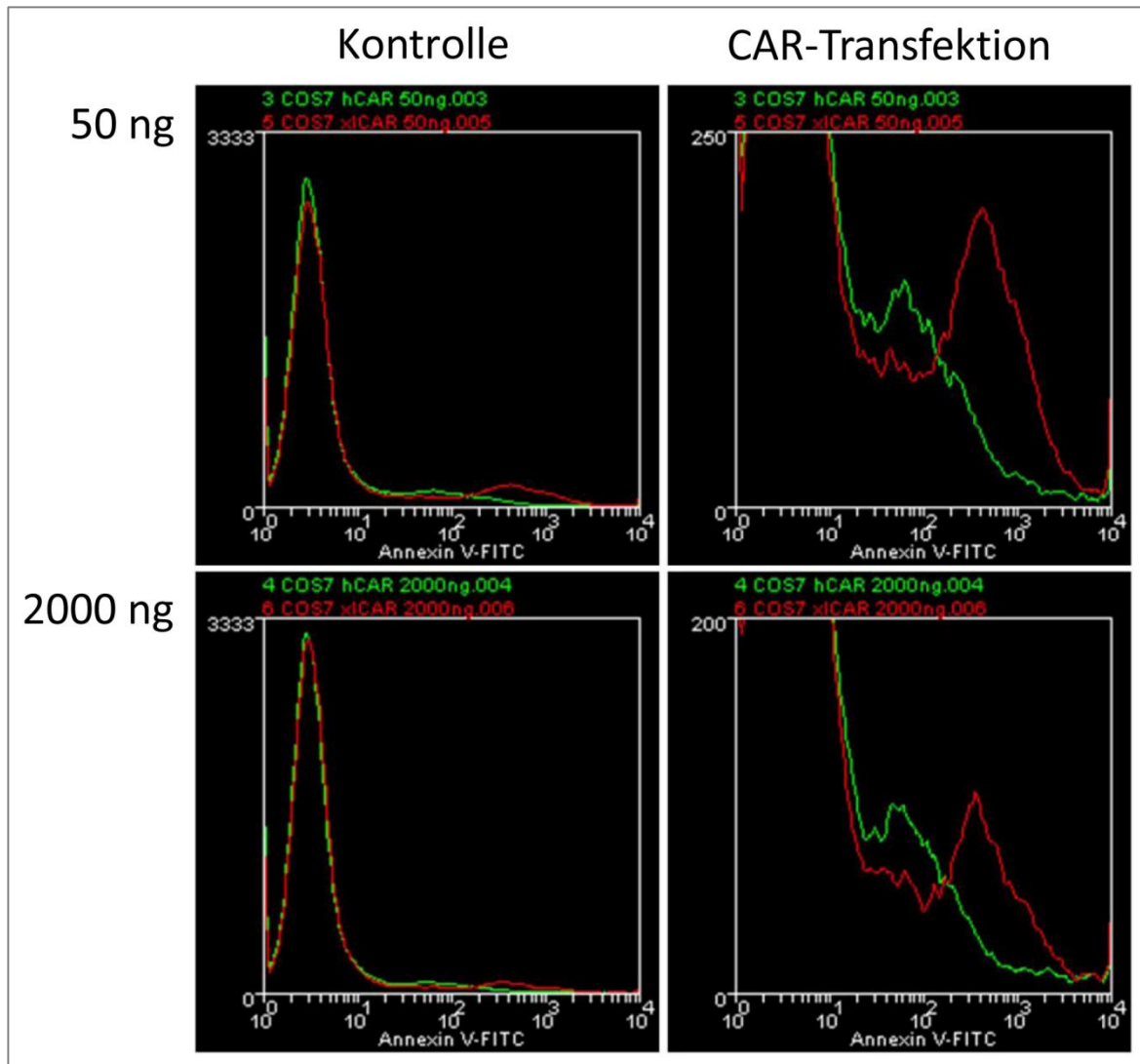


Bild 3.10: Expressionsstärke von hsCAR im Vergleich zu xICAR in COS7-Zellen

COS7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden von hsCAR sowie xICARa, welche C-terminal mit GFP fusioniert waren, transient transfiziert. Die Transfektion erfolgte nach Protokoll der Reportergenassays mit einem TK/DR4 Reportergenkonstrukt. Die Zellen wurden jeweils mit hsCAR (grün) oder xICARa (rot) transfiziert. Links im Bild wurde jeweils nur der Leervektor transfiziert. Es wurden zwei verschiedene Versuche durchgeführt. Oben: Transfektion von 50 ng Rezeptor pro Well, genau wie bei den funktionellen Versuchen im Abschnitt 2.1.15 beschrieben, sowie unten: mit 2000 ng pro Well. Es wurde die Fluoreszenz (FSC) von jeweils 100 000 Zellen gemessen.

Zeitgleich wurde die organspezifische Expressionsstärke der nukleären Rezeptoren von Amphibien und Reptilien von Dr. H. Qiu mittels semiquantitativer PCR überprüft. Die CAR-Gene von *Xenopus laevis* werden im Verdauungstrakt, der Leber, der Niere und der Haut exprimiert. xICARa scheint ubiquitär exprimiert und konnte darüber hinaus auch im Eierstock, dem Gehirn sowie dem Herz detektiert werden. Bei *Anolis carolinensis* wird CAR im Dünndarm, der Leber, der Lunge sowie den Hoden exprimiert (Mathäs *et al.*, 2012). Reptilien und Amphibien CAR wird demnach in Geweben exprimiert, welche im direkten Kontakt zu Fremdstoffen aus der Umwelt sowie der Nahrung stehen. Da acCAR sowie xICARa außerdem in Fortpflanzungsorganen und xICARa in Gehirn und Herz exprimiert werden, ist eine Funktion außerhalb des Fremdstoffmetabolismus zu vermuten.

3.2.3 Determinanten der niedrigen basalen Aktivität von CAR bei Amphibien

Im Verlauf dieses Projekts haben C. Nußhag im Rahmen seiner Doktorarbeit die basale Aktivität sowie U. Goedel-Armbrust die Induzierbarkeit der CAR-Proteine des Menschen mit der von Nichtsäugetieren in Reporter-genversuchen untersucht.

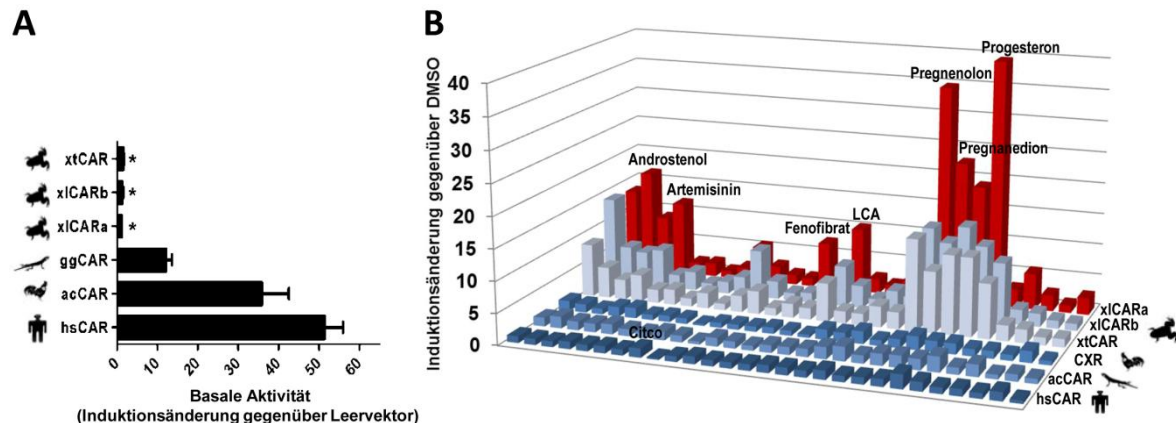


Bild 3.11: Basale Aktivität und Induzierbarkeit der Sauropsida sowie Amphibien-CAR erstellt nach Daten von C. Nußhag und U. Goedel-Armbrust

A Basale CAR-Aktivität von Nichtsäugetier-CAR im Vergleich zu humanem CAR in Reporter-genversuchen mit einem CYP2B6 Reporter-genkonstrukt. **B** CAR abhängige Induktion des DR4-TK Reporter-genkonstrukts mit 28 Substanzen.

Zunächst wurde die basale Aktivität der CARs verschiedener Arten untersucht. Hierfür wurden Luziferase Reporter-gen-Versuche in humanen Darm-Adenokarzinomzellen (LS174T-Zellen) durchgeführt. Als Promotoren des Reporter-gens wurden jene bereits beschriebener Zielgene von hsCAR sowie hsPXR benutzt: CYP2B6, CYP3A4 sowie MDR1. Im Einvernehmen mit bereits publizierten Daten zeigte hsCAR eine hohe basale Aktivität an diesen Promotoren. Der CAR der Sauropsida zeigte ebenfalls eine basale Aktivität. Die getesteten CAR der Amphibien hingegen sind basal nicht aktiv, unabhängig vom getesteten Promotorkonstrukt (Bild 3.11 A). Dies ist eine Gemeinsamkeit mit PXR sowie der Splice-Variante SV2 des humanen CAR. Um das Fehlen von passenden Kofaktoren in der humanen Zelllinie auszuschließen, wurden die Versuche auch in einer Nierenzelllinie von *Xenopus laevis* (XLK-WG) durchgeführt, auch hier zeigte xlCARa keine basale Aktivität (Mathäs *et al.*, 2012). Des Weiteren wurden von D. Baranyai und Dr. O. Burk Versuche mit dem *mammalian-two-hybrid*-System durchgeführt, einer Methode um Protein-Protein Interaktionen sowie Aktivierung unabhängig von der DNA-Bindung zu untersuchen. Beide konnten zeigen, dass die Unterschiede in der basalen Aktivität sowie der Induzierbarkeit des humanen sowie *Xenopus*-CAR unabhängig von der DNA-Bindedomäne sind. Die Interaktion mit dem Heterodimerisierungspartner RXR ist beim humanen CAR konstitutiv hoch und wird im Gegensatz dazu bei xlCARa durch Ligandenbindung verstärkt.

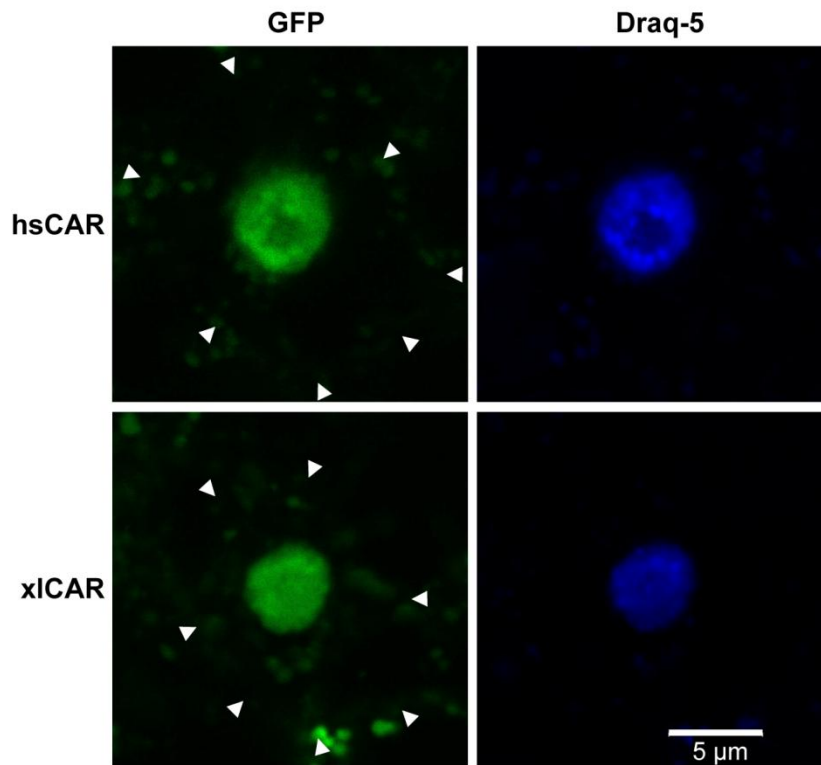


Bild 3.12: Zelluläre CAR Verteilung nach transienter Transfektion in LS174T-Zellen

LS174T-Zellen wurden mit hsCAR sowie xICARa, welche C-terminal mit GFP fusioniert wurden, transient transfiziert. Die Transfektion erfolgte nach Protokoll der Reporterassays mit einem TK/DR4-Reportergenkonstrukt. Die nukleäre Akkumulation nach Transfektion wurde mit dem Laserscanning-Mikroskop aufgenommen. Weiße Pfeilspitzen markieren die Umrisse der Zellmembran. Rechts wird die Kernfärbung mit Draq5 gezeigt.

Da die nukleären Rezeptoren zunächst in den Zellkern gelangen müssen, bevor sie an die DNA binden können, wurde untersucht, ob die niedrige basale Aktivität der *Xenopus*-CAR auf die intrazelluläre Verteilung zurückzuführen ist. Die GFP-Fusionsproteine wurden nach Protokoll der Reporterassays transient transfiziert und die intrazelluläre Verteilung im Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Der humane sowie *Xenopus*-CAR liegen nach einer Transfektion im Zellkern vor (Bild 3.12), eine Retention im Zytoplasma kann als Grund für die niedrige basale Aktivität ausgeschlossen werden.

Dr. O. Burk überprüfte, ob die niedrige basale Aktivität durch eine schwache Bindung an die humanen Promotoren verursacht wird. In *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSAs) zeigte er, dass die Bindung der *Xenopus*-CARs im Vergleich zum humanen und Reptilien-CAR wesentlich schwächer war. Dass die niedrige basale Aktivität der *Xenopus*-CAR nicht auf dieser schwächeren DNA-Bindung beruht, konnte Dr. O. Burk durch EMSAs mit Fusionsproteinen aus der humanen DNA-Bindedomäne mit der jeweiligen *Xenopus laevis*-Ligandenbindedomäne zeigen. Die Bindung zum MDR1-Promotor dieser Fusionsproteine überstieg sogar die des humanen Promotors. In Reporterassays zeigten diese Fusionsproteine allerdings immer noch eine niedrige basale Aktivität. Die niedrige basale Aktivität ist also auf Unterschiede der Arten in der Ligandenbindedomäne

zurückzuführen. Diese Hypothese wurde anschließend von Dr. O. Burk im *mammalian-two-hybrid*-System bestätigt. Es wurde gezeigt, dass die basale Interaktion von *Xenopus*-CAR mit dem Heterodimerisierungspartner RXRa sowie dem Kofaktor PGC1- α wesentlich schwächer ist als die des humanen sowie die des acCAR. Versuche mit RXRa des *Xenopus* sowie SRC-1 beider Arten zeigten ähnliche Ergebnisse.

3.2.4 Ligandenspektrum von *Xenopus laevis* CAR

Die Aktivierbarkeit der CAR-Proteine unterschiedlicher Arten wurde von U. Goedel-Armbrust in Reporter-genversuchen untersucht. Getestet wurden Medikamente, Steroidhormone sowie Gallensäuren in transient transfizierten LS174T-Zellen. Als Promotor des Reportergens wurden ein DR4-DNA-Bindeelement des MDR1-Promotors vor das 5'-Ende des Thymidinkinasepromotors kloniert. Die *Xenopus*-CAR hatten im Vergleich zu den CAR der anderen Arten ein größeres Substratspektrum und die Aktivität konnte stärker gesteigert werden, auf bis das 40-fache, durch Pregnenolon und Progesteron. Ähnliches konnte auch von Dr. O. Burk in *mammalian-two-hybrid*-Versuchen gezeigt werden. Eine Induktion mit Artemisinin, Androstanol sowie Pregnenolon steigerte die Interaktion mit RXRa sowie PGC-1 α unter Zugabe von RXRa, um das 3- bis 7-fache. Bei acCAR konnte eine bis zu doppelt so starke Interaktion gemessen werden. Beim humanen CAR konnte keine Steigerung der Protein-Protein-Interaktion durch Liganden beobachtet werden.

Die Konzentrationen der Liganden für die Reporter-genassays wurden basierend auf Daten zur Induktion von humanem CAR und PXR ausgewählt. Um zu testen, ob die benutzten Substanzen in Konzentrationen eingesetzt wurden, bei denen die volle Effektstärke von xlCAR α zu beobachten ist, wurde eine Dosis-Wirkungskurve für 6 strukturell unterschiedliche, starke xlCAR α -Liganden (Androstanol, Artemisinin, Fenofibrat, LCA, Pregnenolon sowie Progesteron) erstellt (Bild 3.13) und die jeweiligen EC₅₀-Werte bestimmt. Transfizierte LS174T-Zellen wurden mit 10 verschiedenen Konzentrationen der Liganden behandelt. Androstanol sowie Pregnenolon fielen ab einer Konzentration von 30 μ M im Zellkulturmedium aus. Progesteron war ab einer Konzentration von 100 μ M zelltoxisch. Für die Transfektion wurde ein Reporter-genkonstrukt mit dem MDR1/TK-Promotor benutzt. Die in (Tabelle 3.3) aufgelisteten EC₅₀-Werte wurden mit dem Programm GraphPad Prism bestimmt oder falls dies nicht möglich war aus dem Graphen abgelesen. Die ermittelten EC₅₀-Werte passen zu den in den Reporter-genassays eingesetzten Konzentrationen (Tabelle 3.3).

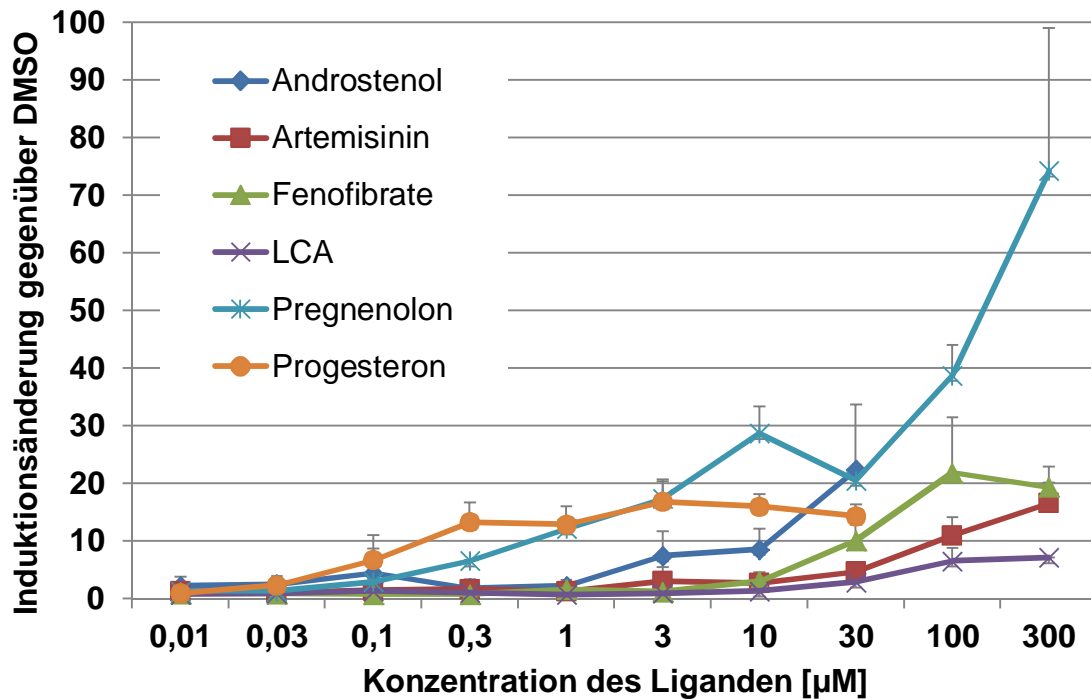


Bild 3.13: EC₅₀-Werte für xICARa-Liganden

Für Reporterassays in LS174T-Zellen wurde ein DR4/TK Reporterassay benutzt. Induziert wurden 6 Liganden in 10 verschiedenen Konzentrationen. Die EC₅₀-Werte wurden abgelesen: Androstenol, 8,5 µM; Artemisinin, > 60 µM; Fenofibrat, >10 µM; LCA, 75 µM; Pregnenolon, 1,4 µM sowie Progesteron, 0,1 µM. n=4

Tabelle 3.3: Vergleich der eingesetzten Ligandenkonzentrationen mit den ermittelten EC₅₀-Werten

Substanz	Konzentration	EC ₅₀ -Wert
Androstenol	10 µM	8,5 µM
Artemisinin	100 µM	> 60 µM
Fenofibrat	10 µM	> 10µM
LCA	100 µM	75 µM
Pregnenolon	10 µM	1,4 µM
Progesteron	10 µM	0,1 µM

Für Fenofibrat liegt die eingesetzte Konzentration knapp unter dem EC₅₀-Wert. Die ca. 7-fache Aktivierbarkeit von xICARa durch 10 µM Fenofibrat unterschätzt die Potenz des Liganden leicht. Alle Konzentrationen befinden sich im nicht toxischen Bereich.

3.2.5 Funktionelle Untersuchungen zur Helix 11‘

Strukturmodelle des humanen CAR, welche mit Röntgenkristallographie erstellt wurden, zeigen jeweils zwischen Helix 9/10 und Helix 12 eine kurze einmal gewundene Helix. Diese kurze Helix wird als H11‘ oder auch Hx bezeichnet und soll für die hohe basale Aktivität von CAR verantwortlich sein (Xu *et al.*, 2004). In der Röntgenstrukturanalyse des humanen PXR wird in diesem orthologen Bereich eine unstrukturierte, flexible Schleife dargestellt. Das gleiche wird für xlCARa im Proteinmodell von Dr. B. Windshügel gezeigt. Der Bereich zwischen Helix 9/10 und Helix 12 von xlCARa ist mit acht Aminosäuren zwei Aminosäuren länger als der Bereich des hsCAR. Um den Einfluss dieses Längenunterschieds zu untersuchen, wurden zwei Aminosäuren: Asparaginsäure (D408) und Isoleucin (I409) aus dem Bereich der H11‘ deletiert. Dies führte im Reporter-Gen-Versuch in LS174T-Zellen mit dem DR4/TK-Reporter-Gen-Konstrukt zu einer Reduktion der im Vergleich zu hsCAR bereits niedrigen basalen Aktivität sowie zu einer signifikant verminderten Induzierbarkeit durch die Liganden Artemisinin, Fenofibrat sowie Pregnandion (Bild 3.14). Das Einfügen zweier Aminosäuren (Asparagin sowie Isoleucin) nach Glutamin (Q334) in die H11‘ des hsCAR, führte ebenfalls zu einer Reduktion der basalen Aktivität sowie der Induzierbarkeit durch den Liganden Artemisinin um mehr als die Hälfte.

Um das Proteinmodell von Dr. B. Windshügel zu überprüfen, wurde getestet, ob bei xlCARa eine α -helikale Struktur im Bereich der H11‘ vorliegt. Dazu wurde die Aminosäure Prolin (P) als „Strukturbrecher“ in die H11‘ des *Xenopus*-CAR anstelle des Asparagins (N413P) eingefügt. Um die Auswirkungen der Prolinmutation bei xlCARa besser messbar zu machen, wurde die Prolinmutation in eine basal-aktive Doppelmutante (Met316Phe, Met272Val) (Mathäs *et al.*, 2012) von xlCARa eingefügt. Der humane CAR wurde als Kontrolle benutzt (A338P). Die basale Aktivität der humanen Prolinmutante ist signifikant reduziert, die basale Aktivität der konstitutiv aktiven Doppelmutante des xlCARa hat keine veränderte basale Aktivität. Dies bestätigt das Strukturmodell von Dr. B. Windshügel, in dem keine α -helikale Struktur im Bereich der H11‘ des xlCARa vorliegt.

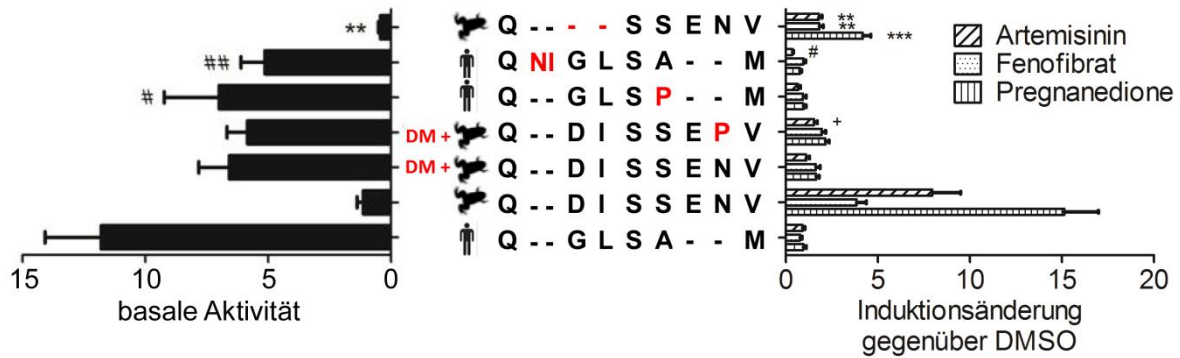


Bild 3.14: Funktionelle Charakterisierung der H11' des *Xenopus*- sowie des humanen CAR

Reporterergenversuche wurden in LS174T-Zellen durchgeführt, welche mit einem TK/DR4-Luziferasereportergenkonstrukt transfiziert wurden. Die basale sowie ligandenabhängige Aktivität des xICARa, des hsCAR sowie der basal aktiven Doppelmutante Met316Phe/Met272Val wurden mit Mutanten der H11' verglichen. Untersucht wurde die Deletion bzw. Insertion von zwei Aminosäuren in xICARa bzw. hsCAR sowie die Einführung der Aminosäure Prolin als „Helixbrecher“. Die angegebenen Werte sind jeweils normalisierte Luziferaseaktivitäten als Mittelwerte \pm SEM (n=12). Einfaktorielle Varianzanalyse mit Dunnett-Tests oder t-Test wurden gegen den jeweiligen Wildtyprezeptor durchgeführt. # = unterschiedlich von hsCAR, * = unterschiedlich von xICARa, + = unterschiedlich von der Doppelmutante Met316Phe/Met272Val (drei Symbole, $P < 0,001$; zwei Symbole, $P < 0,01$; ein Symbol, $P < 0,05$)

3.2.6 Strukturunterschiede des humanen und *Xenopus*-CAR

3.2.6.1 Proteinfaltung zwischen Helix 1 und Helix 3

Für den unter Abschnitt 3.2.1 beschriebenen interhelikalen Bereich zwischen Helix 1 und Helix 3 wurde die Proteinfaltung untersucht und der längste zusammenhängende intrinsisch ungeordnete Abschnitt im Bereich des Indels in Aminosäuren gemessen. Da orthologe Sequenzbereiche im humanen CAR nicht vorhanden sind, gibt es keine ungefalteten Aminosäuren in diesem Bereich. Im humanen PXR wird eine 33 AS lange lückenlose Sequenz vorhergesagt. Analysiert wurden außerdem zwei Vögel: Beim Huhn (gg) sind es 34 AS und bei der Wachtel (cj) 32 AS. Damit ist die intrinsische Unordnung im interhelikalen Bereich von CAR bei Vögeln am größten, gefolgt von den Amphibien: 22 AS bei xICARa, 13 AS bei xICARb sowie 20 AS bei xtCAR. Diese Ähnlichkeit mit PXR hat der CAR der Reptilien genau wie der humane CAR nicht. Für acCAR wurden keine langen zusammenhängenden ungefalteten Bereiche gefunden (Bild 3.15).

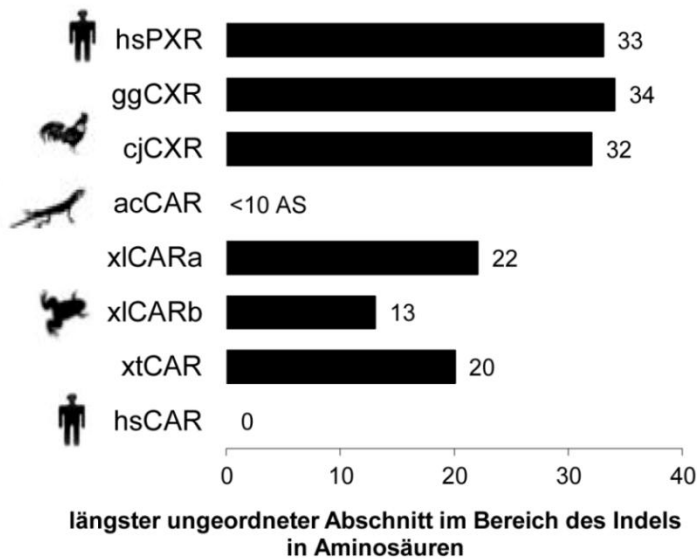


Bild 3.15: Intrinsische Unordnung der interhelikalen Sequenz C-terminal der Helix 3 von humanem CAR sowie PXR im Vergleich zu Nichtsäugetier CAR

Die Proteinfaltung wurde mit dem PONDER VL3H Algorithmus analysiert. Angegeben ist der längste, zusammenhängende, ungeordnete Abschnitt im Bereich des Indels C-terminal der Helix 3 in Aminosäuren. Mensch (*Homo sapiens*, hs), Huhn (*Gallus gallus*, gg), Wachtel (*Coturnix japonica*, cj), Eidechse (*Anolis carolinensis*, ac), Krallenfrösche (*Xenopus laevis*, xl und *Xenopus tropicalis*, xt)

3.2.6.2 Funktion des interhelikalen Bereichs zwischen Helix 1 und Helix 3

Für das Homologiemodell von Dr. B. Windshügel konnte kein anderer nukleärer Rezeptor als Vorlage für den nicht konservierten Sequenzbereich zwischen Helix 1 und Helix 3 dienen. Außerdem ergaben Sekundärstrukturprognosen von Dr. B. Windshügel ebenfalls ein strukturloses Loop in diesem Bereich. Die Aminosäuren 199-230 wurden deswegen bei der Modellierung ausgeschlossen. Um dieses Vorgehen zu untermauern, wurde von C. Nußhag während seiner Doktorarbeit dieser Bereich im Reporter-gen-Versuch in LS174T-Zellen mit einem Cyp3A4-Reporter-genkonstrukt untersucht. Eine Deletion der Aminosäuren 186-229 hatte weder Einfluss auf die basale Aktivität noch auf die Induzierbarkeit von xlCARa durch die Liganden Artemisinin, Fenofibrat oder Pregnandion. Im Vergleich zum humanen CAR hat PXR genau wie xlCARa ein interhelikale Loop. Bei PXR werden für diesen Bereich allerdings Sekundärstrukturen vorhergesagt, welche die Konformation der Ligandenbindedomäne beeinflussen. Es wurden die Aminosäuren 182-233 aus PXR deletiert und die Funktion des Proteins im Reporter-genversuch in LS174T-Zellen mit dem DR4/TK-Promotorkonstrukt untersucht. Die Deletionsmutante von PXR ist funktionslos. Sie zeigt basal keine Aktivität mehr und ist durch keinen der sieben getesteten hsPXR Liganden: SR12813, Rifampicin, 6,16a-Dimethyl-Pregnenolon, Pregnandion, Phenobarbital, Lovastatin sowie Artemisinin aktivierbar (Bild 3.16). Die Proteinexpression der PXR-Deletionsmutante konnte nach in vitro Translation sowie in transfizierten Zellen mittels Westernblot gezeigt werden. Dies

lässt den Schluss zu, dass das Indel zwischen Helix 1 und Helix 3 des xICARa nicht an der Bildung der Ligandenbindetasche beteiligt ist und somit aus dem Modell ausgeschlossen werden kann.

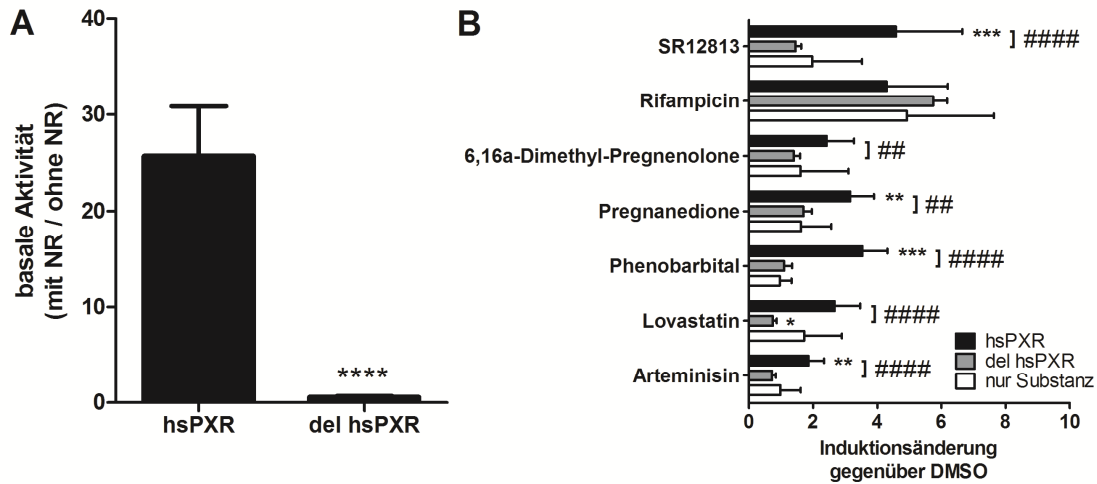


Bild 3.16: Die Rolle des interhelikalen Bereichs C-terminal der Helix 3 für die Funktion des hsPXR

Basale (A) sowie ligandenabhängige (B) Aktivität des Wildtyp-hsPXR sowie seiner Deletionsmutante, bei welcher der interhelikale Bereich (AS 182–233) fehlen. Für den Reportergenversuch wurden LS174T-Zellen mit einem Luziferasegen unter der Kontrolle des DR4/TK-Promotors transfiziert. Gezeigt sind normalisierte Luziferaseaktivitäten als Mittelwerte \pm SEM. Für die basale Aktivität wurde ein t-Test durchgeführt (####, $P < 0,0001$), für die ligandenabhängigen Aktivitäten wurden einfaktorielles Varianzanalysen mit Dunnett's Post-hoc-Test gegen Aktivitäten nur mit Substanz durchgeführt (***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$). Unterschiede in der Induzierbarkeit durch Liganden wurden mit t-Tests überprüft (####, $P < 0,0001$; ## $P < 0,01$), $n=6$.

3.2.6.3 Zuordnung der Proteinfunktion zu einzelnen Proteinstrukturen: Humanisierung einzelner Aminosäuren des xICARa

Der humane CAR und der *Xenopus*-CAR unterscheiden sich in ihrer basalen Aktivität sowie Induzierbarkeit. Während der humane CAR eine hohe basale Aktivität hat, welche durch Ligandenbindung bis auf das Doppelte gesteigert werden kann, hat xICARa eine niedrige basale Aktivität, die durch Ligandenbindung bis zu 40-fach gesteigert werden kann. Um Determinanten der basalen Aktivität sowie der Induzierbarkeit an einzelnen Proteinstrukturen und Aminosäuren festzumachen, wurden Aminosäuren des xICARa sowie des hsCAR mutiert.

Mutation in xICARa	basale Aktivität		Artemisinin		Fenofibrat		Pregnanedione	
		SEM		SEM		SEM		SEM
Leu155Thr	0,79	0,06	1,17	0,19	1,00	0,08	1,04	0,10
Leu155Glu & Pro253Ser	0,72	0,06	0,72	0,07	0,92	0,12	0,86	0,10
Ile242Val	0,66 ***	0,06	0,37 ***	0,03	0,50 ***	0,07	0,89	0,13
Met272Val & Met316Phe	11,73 ***	0,86	0,26 ***	0,04	0,32 ***	0,04	0,11 ***	0,01
Tyr283Phe	0,99	0,09	1,52	0,25	1,59	0,41	1,43	0,23
His295Leu	1,04	0,10	1,13	0,18	0,81	0,11	1,43	0,21
Lys296Arg	0,96	0,08	0,97	0,11	0,75	0,11	1,06	0,09
Lys296Leu	0,62 *	0,07	0,96	0,12	0,67 *	0,06	1,37	0,20
Phe297Tyr	1,24	0,16	1,40	0,20	1,14	0,17	1,19	0,20
Thr305Val	8,55 ***	1,00	0,46 ***	0,06	0,35 ***	0,05	0,23 ***	0,03
Cys339Ala	1,00	0,06	0,73	0,13	0,75	0,11	0,88	0,10
Ser410Ala	0,93	0,10	1,09	0,16	1,28	0,15	1,14	0,14
Met272Val & Met316Phe & Ser410Ala	8,98 ***	1,25	0,21 ***	0,03	0,55 ***	0,07	0,14 ***	0,01
Wildtyp	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00

Bild 3.17: Basale sowie ligandenabhängige Aktivität von 13 xICARa Mutanten im Vergleich zum Wildtyp

LS174T-Zellen wurden mit einem DR4/TK-Promotor abhängigen Luziferase-Reportergenkonstrukt transfiziert und wurden mit drei Induktoren von xICARa behandelt: Artemisinin (100 μ M), Fenofibrat (10 μ M) sowie Pregnanedion (10 μ M). Die Werte geben jeweils Aktivitätsänderungen gegenüber dem Wildtyp-xICARa an. Die Effekte sind farblich hinterlegt: Induktion (grün), Repression (rot), keine Änderung (gelb). Statistisch signifikante Unterschiede im *one-sample* t-Test mit logarithmisierten Werten (log₂) gegen den hypothetischen Wert 0 sind mit Sternchen gekennzeichnet. Die P-Werte wurden durch Bonferroni-Korrektur per Hand herabgesetzt (***, P<0,0001; **, P<0,00076; *, P<0,0038), n=4-11 (siehe Anhang S. 99).

Mutation in hsCAR	basale Aktivität		Artemisinin		Fenofibrat		Pregnanedione	
		SEM		SEM		SEM		SEM
Thr116Leu	0,66 ***	0,02	1,10	0,10	1,01	0,05	1,41	0,22
Thr116Glu & Pro180Ser	0,46 ***	0,04	1,00	0,04	1,04	0,11	1,63	0,26
Arg223Lys	0,74 *	0,05	1,18	0,08	1,47	0,26	1,69	0,29
Arg223Leu	0,68 *	0,06	1,11	0,17	1,10	0,16	1,84	0,56
Ser337Ala	0,78	0,14	1,66 *	0,21	2,16	0,56	1,83	0,29
Wildtyp	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00

Bild 3.18: Basale sowie ligandenabhängige Aktivität von hsCAR Mutanten im Vergleich zum Wildtyp

LS174T-Zellen wurden mit einem DR4/TK-Promotor abhängigen Luziferase-Reportergenkonstrukt transfiziert. Fünf hsCAR-Mutanten wurden mit drei Induktoren behandelt: Artemisinin (100 μ M), Fenofibrat (10 μ M) sowie Pregnanedion (10 μ M). Die Werte geben jeweils Aktivitätsänderungen gegenüber dem Wildtyp-hsCAR an. Die Effekte sind farblich hinterlegt: Induktion (grün), Repression (rot), keine Änderung (gelb). Statistisch signifikante Unterschiede im *one-sample* t-Test mit logarithmisierten Werten (log₂) gegen den hypothetischen Wert 0 sind mit Sternchen gekennzeichnet. Die P-Werte wurden durch Bonferroni-Korrektur per Hand herabgesetzt (***, P<0,0002; **, P<0,002; *, P<0,01), n=4-11 (siehe Anhang S. 99).

Von Dr. B. Windshügel wurden Aminosäuren anhand von Sequenzvergleichen sowie visueller Analyse des xICARa Protein-Homologiemodells ausgesucht. Außerdem wurden positiv selektionierte Aminosäuren von Dr. H. Herlyn berechnet. Beide Analysen wurden auf die Ligandenbindetasche begrenzt, da die Unterschiede der basalen Aktivität sowie der Induzierbarkeit von der Ligandenbindedomäne abhängig sind (vgl. Abschnitt 3.2.3). Es wurden insgesamt 13 Mutanten des xICARa und 5 Mutanten des humanen CAR erstellt. Die basale Aktivität sowie die Induzierbarkeit aller Mutanten wurden in Reporteranalysen mit dem DR4/TK-Reportergenkonstrukt in LS174T-Zellen mit der

des Wildtypen verglichen. Die Mehrzahl der Mutanten zeigte keine Veränderung gegenüber dem Wildtyp.

3.2.6.4 Mutationen positiv selektionierter Aminosäuren

Die positiv-selektionierten Aminosäuren wurden Synthenie-basierend mit einem alternativen Modell berechnet. Das bedeutet, dass für die Analysen der Stammbaum der Tiere vorgegeben wurde. Als Außengruppe benutzte Dr. H. Herlyn PXR der Strahlenflosser. Aminosäuren mit einem P-Wert von über 0,5 sind wahrscheinlich positiv selektioniert. Untersucht wurde eine Position auf dem Vertebraten-CAR-Ast (Bild 3.19) mit einem P-Wert über 0,9: Thr116 des hsCAR. Die orthologe Position des xlCARa ist Leu155. In der Helix 11' des xCARa liegt die positiv selektionierte Aminosäure Ser410, welche der Aminosäure Ser337 des hsCAR entspricht. Der P-Wert für diese Aminosäure ist 0,98 auf dem Vertebraten-CAR-Ast (Bild 3.19). Außerdem wurde eine Position auf dem Amniota-Ast mit einem Wert über 0,9 untersucht: Arg223 des hsCAR. Die orthologe Position des xlCAR ist Lys296. Eine weitere wahrscheinlich positiv selektionierte Aminosäure auf dem Amniota-Ast ist Cys339 des xlCARa mit einem P-Wert von 0,79.

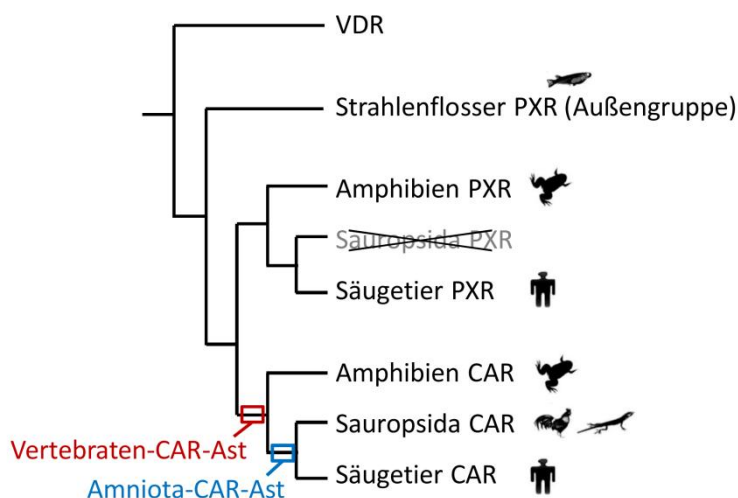


Bild 3.19: Stammbaum der NR11-Familie – Scenario 1

Die phylogenetisch analysierten Äste sind farblich markiert: Der Vertebraten-Ast rot sowie der Amniota-Ast blau. Der Zeitpunkt der Genomduplikation (WGD) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Grau gedruckte, durchgestrichene Gengruppen gingen verloren und existieren nicht.

Da diese Phylogenie von Dr. H. Qiu im Verlauf dieses Projekts widerlegt wurde, sind die positiv-selektionierten Positionen nicht gültig. Dr. H. Qiu konnte zeigen, dass CAR, PXR und VDR durch eine vollständige Genomduplikation in den frühen Vertebraten entstanden (Bild 3.20). Somit bilden die Strahlenflosser mit PXR keine Außengruppe. Passend zu diesem Ergebnis zeigt keine der berechneten positiv-selektionierten Positionen einen signifikanten Effekt nach Humanisierung der Position im xlCARa (Leu155Thr, Lys296Arg, Cys339Ala, Ser410Ala) (Bild 3.17) sowie weniger als 2-fache Veränderungen

bei der Mutation der Aminosäuren im hsCAR zu orthologen Aminosäuren des xlCARa (Thr116Leu, Arg223Lys, Ser337Ala) (Bild 3.18). Auch die Mutation der Aminosäure Ser410 in der basal-aktiven Doppelmutante Met272Val/Met316Phe macht keine funktionellen Einflüsse auf die Proteinstruktur sichtbar (Bild 3.17). Die Aminosäure Lys296 des xlCARa bildet nach Dr. B. Windshügel außerdem eine Salzbrücke mit Glu291. Dies könnte zur Stabilisierung des beta2-Stranges von xlCARa beitragen. Um die mögliche Interaktion mit Glu291 und den Effekt des Verlustes der Salzbrücke auf die basale Aktivität sowie die Induzierbarkeit durch Liganden von xlCARa zu untersuchen, wurde zusätzlich die aliphatische Aminosäure Leucin eingebaut (Lys296Leu). Diese Mutante unterscheidet sich signifikant vom Wildtyp. Mutation der orthologen Position im hsCAR führt ebenfalls zu einer signifikanten Änderung der hsCAR-Funktion (Arg223Leu). Für Leu155 wurde ebenfalls eine Doppelmutante angefertigt, da so an diesen Positionen eine Quervernetzung des gesamten Proteins wie bei hsPXR entsteht (Leu155Glu und Pro253Ser). Diese Mutante zeigt keine signifikante Änderung gegenüber dem Wildtyp. Durch die Doppelmutation Thr116Glu und Pro180Ser im hsCAR könnte eine Quervernetzung ähnlich der des hsPXR entstehen, da diese Mutante die basale Aktivität des hsCAR extrem signifikant reduziert. Die Induzierbarkeit bleibt im Vergleich zum Wildtyp-hsCAR unverändert (Bild 3.17).

Die Analyse zur positiven Selektion wurde von Dr. H. Herlyn wiederholt. Diesmal wurde nicht die PXR der Strahlenflosser als Außengruppe benutzt, sondern VDR (Bild 3.20). Für die Synthenie basierte Berechnung der positiv selektionierten Aminosäuren wurde nun der gemeinsame Ursprung von PXR und CAR durch Genomduplikation berücksichtigt. Diese Analyse führt zu einem anderen Ergebnis. Die Ast-Codon-Analyse wurde mit dem Nullmodell sowie dem alternativen Modell durchgeführt und ergab signifikante Unterschiede. Die nach dem alternativen Modell positiv selektionierten Aminosäuren der Ligandenbindedomäne sowie die statistisch berechneten Häufungen sind in Tabelle 3.4 sowie Tabelle 3.5 aufgelistet.

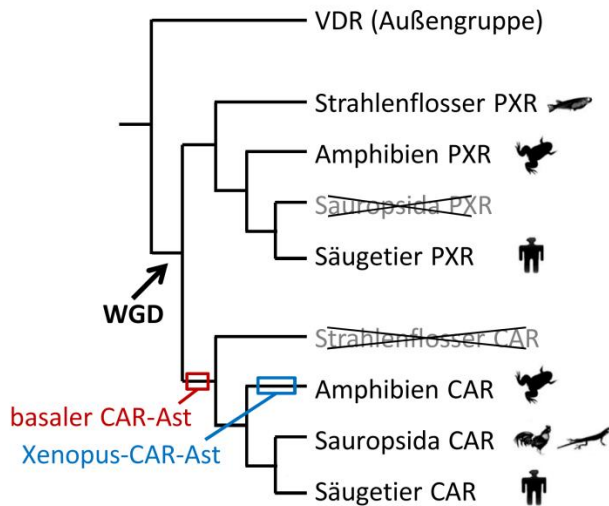


Bild 3.20: Stammbaum der NR1I-Familie – Scenario 2

Phylogenetische Analyse der farblich markierten Äste unter Berücksichtigung des gemeinsamen Ursprungs von PXR und CAR durch Genomduplikation: der basale CAR-Ast (rot) sowie der *Xenopus*-CAR-Ast (blau). Der Zeitpunkt der Genomduplikation (WGD) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Grau gedruckte, durchgestrichene Gengruppen gingen verloren und existieren nicht.

Tabelle 3.4: Ast-Codon-Analyse des *Xenopus* CAR-Astes

P-Wert	ancestraler Zustand	abgeleiteter Zustand	xICARa	Häufung
0,757	C	A	A275	1
0,514	T	R	R281	
0,601	W	F	F290	
0,676	Q	K	K419	

Tabelle 3.5: Ast-Codon-Analyse des basalen CAR-Astes

P-Wert	ancestraler Zustand	abgeleiteter Zustand*	hsCAR	xICARa	Häufung
0,738	E	I	T116	L155	
0,619	T	N	H124	H163	
0,520	T	S	N165	S238	1
0,846	D	Q	Q171	Q244	
0,761	N	K	K174	Q247	
0,894	M	E	D178	D251	
0,548	Y	A	S181	A254	
0,590	R	Q	V205	Q278	
0,522	R	N	Q215	N288	2
0,691	C	S	T225	S298	
0,826	L	Y	F238	Y311	
0,728	E	A	P257	A330	
0,646	Q	V	Q276	V349	

P-Wert	ancestraler Zustand	abgeleiteter Zustand*	hsCAR	xICARa	Häufung
0,623	T	S	S294	C367	3
0,750	C	R	G298	L371	
0,771	N	G	D305	S378	
0,578	I	L	L312	L385	4
0,585	M	L	L313	L386	
0,816	W	L	L315	L388	
0,892	K	R	Y328	R401	
0,930	Q	S	S337	S410	

*Aminosäure so im basalen CAR-Ast angelegt

3.2.6.5 Mutationen zur Unterstützung des Proteinmodells von xICARa

Im xICARa wurden weitere humanisierende Mutanten untersucht. Die Positionen wurden von Herrn Dr. B. Windshügel anhand des Homologiemodells ausgesucht. Einige Mutationen hatten keine Auswirkung auf die basale Aktivität sowie die Induzierbarkeit durch die Liganden Artemisinin, Fenofibrat sowie Pregnandion: Tyr283Phe, His295Leu, Phe297Tyr, Ser410Ala (Bild 3.17). Es wurden insgesamt 5 Positionen im xICARa mit signifikantem Einfluss auf die basale Aktivität identifiziert: Ile242Val, Met272Val, Met316Phe, Lys296Leu sowie Thr305Val.

Die Mutanten Met272Val sowie Met316Phe wurden von C. Nußhag im Verlauf seiner Doktorarbeit charakterisiert. Met272Val erhöhte die basale Aktivität des xICARa ungefähr 3-fach, durch Met316Phe wurde die basale Aktivität 5-fach erhöht (Mathäs *et al.*, 2012). Die Doppelmutante Met272Val/Met316Phe zeigte eine 12-fach erhöhte basale Aktivität im Vergleich zum Wildtyp und übertraf damit die basale Aktivität des humanen CAR (Bild 3.17) (Mathäs *et al.*, 2012). (Die Reporterassays für diese Doppelmutante wurden von K. Römer während ihrer Diplomarbeit durchgeführt). Im *mammalian-two-hybrid*-Versuchssystem wurde eine signifikant verstärkte Interaktion der beiden einzelnen Mutanten Met272Val sowie Met316Phe mit dem Kofaktor PGC-1a in Anwesenheit des Heterodimerisierungspartners RXRa gefunden (Bild 3.23). Die Aktivierbarkeit durch Liganden ist dagegen bei den Einzelmutanten sowie der Doppelmutante signifikant vermindert (Mathäs *et al.*, 2012). Die Aktivität der Doppelmutante in Reporterassays mit Pregnandion-Induktion wurde im Vergleich zum Wildtyprezeptor um das 10-fache vermindert (Bild 3.17). Dennoch wurde im *mammalian-two-hybrid*-System eine signifikante Zunahme der Interaktion mit dem Kofaktor PGC-1a nach Heterodimerisierung mit RXRa und Pregnandion-Induktion für die Einzelmutante Met316Phe sowie für die Doppelmutante gemessen (Bild 3.23).

Vergleichbar hoch ist die 9-fache basale Aktivität der xICARa Mutante Thr305Val (Bild 3.17). Im *mammalian-two-hybrid*-Versuchssystem konnte gezeigt werden, dass die Mutante basal extrem signifikant stärker mit dem humanen Heterodimerisierungspartner RXRa (Bild 3.21) sowie dem Kofaktor PGC-1a nach Heterodimerisierung mit RXRa (Bild 3.23) interagiert. Die basale Interaktion mit den humanen Kofaktoren SRC-1 ist ebenfalls erhöht (Bild 3.22). Die Induzierbarkeit ist genau wie bei der basal-aktiven Doppelmutante durch alle drei Liganden extrem reduziert. Dennoch ist die Interaktion mit SRC-1 unter Zugabe von Pregnandion signifikant erhöht, was auch von Dr. O. Burk in einem *coactivator-dependent receptor ligand assay* (CARLA) mit Hilfe von GST-SRC1-Fusionsproteinen und 35S-Met markierten Rezeptoren bestätigt werden konnte. Die Interaktion mit PGC-1a bei Kotransfektion von RXR war bei Induktion mit Fenofibrat sehr signifikant erhöht (Bild 3.23). Für die Mutante His295Leu wurden weder im Reporterassay noch im *mammalian-two-hybrid*-Versuchssystem signifikante Unterschiede zum Wildtyprezeptor gemessen.

Die basale Aktivität der Mutanten Ile242Val sowie Lys296Leu sind vermindert, genau wie ihre Induzierbarkeit durch Liganden. Mutanten, welche lediglich einen Einfluss auf die Induzierbarkeit ohne Veränderung der basalen Aktivität haben, wurden für xICARa nicht gefunden.

Zwei weitere Mutanten Thr311Phe und Val315Ile, welche mit Liganden im Homologiemodell direkt interagieren, wurden von C. Nußhag im Verlauf seiner Doktorarbeit in Reporterassays untersucht. Thr311 interagiert mit jedem der drei untersuchten Liganden (Artemisinin, Fenofibrat und Pregnandion). Val315 interagiert mit Fenofibrat und Pregnandion. Die Induzierbarkeit von Thr311Phe durch Fenofibrat ist signifikant erhöht. In Versuchen mit dem *mammalian-two-hybrid*-System wurden diese Daten verifiziert: Nach Bindung von Fenofibrat ist die Interaktion mit RXRa extrem signifikant erhöht sowie mit dem Kofaktor SRC-1 sehr signifikant erhöht (Bild 3.21, Bild 3.22). Für die Mutante Val315Ile wurden weder in Reporteranalysen noch im *mammalian-two-hybrid*-Versuchssystem signifikante Unterschiede zum Wildtyp gemessen.

Die ausgeprägte Induzierbarkeit von xICARa durch Liganden resultiert aus einer verstärkten RXRa-Interaktion nach Ligandenbindung (Mathäs *et al.*, 2012), (Bild 3.21). Dies könnte auch mit einer Ausrichtung der Aminosäure Phe234 in Richtung H12 verbunden sein wie bereits für hsCAR beschrieben (Windshügel and Poso, 2011), die entsprechende Aminosäure im hsCAR ist Phe161 und interagiert mit H11' sowie H10/11 nur in Anwesenheit von Liganden. Für die einzige nicht humanisierende Mutation Phe234Ala wurden ausschließlich Protein-Protein-Interaktionen mit dem *mammalian-two-hybrid*-System untersucht. Eine signifikante Reduktion der Interaktion mit dem Kofaktor

SCR-1 im Vergleich zum Wildtyprezeptor nach Induktion mit Fenofibrat sowie Pregnandion wurde bei Kotransfektion von RXRa gefunden. Die basale Interaktion ist im Vergleich zum Wildtyprezeptor unverändert (Bild 3.22).

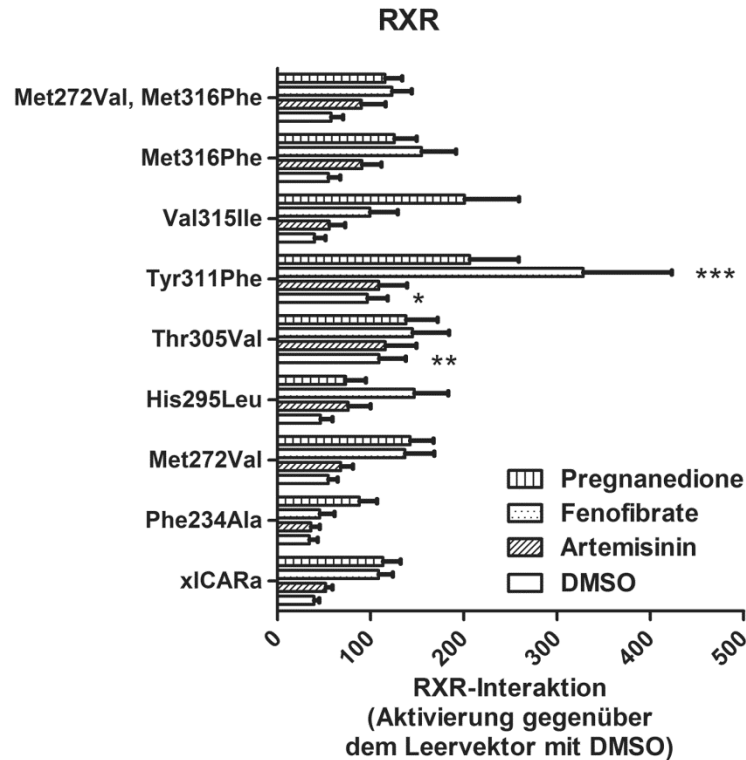


Bild 3.21: Basale und ligandenabhängige Heterodimerisierung von xICARa sowie xICARa-Mutanten mit RXRa

Mammalian-two-hybrid-Versuche wurden in COS7-Zellen durchgeführt, welche mit Expressionsplasmiden für ein GAL4-DBD/RXRa-LBD-Fusionsprotein sowie einem Expressionsplasmid, welches ein VP16-AD/xICARa-Fusionsprotein codiert transfiziert wurden. Konstitutive sowie ligandenabhängige Interaktionen von xICARa sowie den angegebenen Mutanten mit dem Heterodimerisierungspartner RXRa wurden getestet. Es wurden acht xICARa Mutanten mit drei Induktoren von xICARa behandelt: Artemisinin (100 μ M), Fenofibrat (10 μ M) und Pregnandion (30 μ M). Die angegebenen Werte sind jeweils die normalisierten Aktivierungsfaktoren im Vergleich zum Leervektor (DMSO). Die Interaktion der beiden Fusionsproteine wurde über ein GAL4-abhängiges Promotorkonstrukt mit Luziferaseexpression gemessen. Statistisch signifikante Unterschiede mit einfaktorierter Varianzanalyse und Dunnett-Test gegen den Wildtyprezeptor, induziert mit der jeweiligen Substanz, sind mit Sternchen gekennzeichnet (***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$), $n=6$.

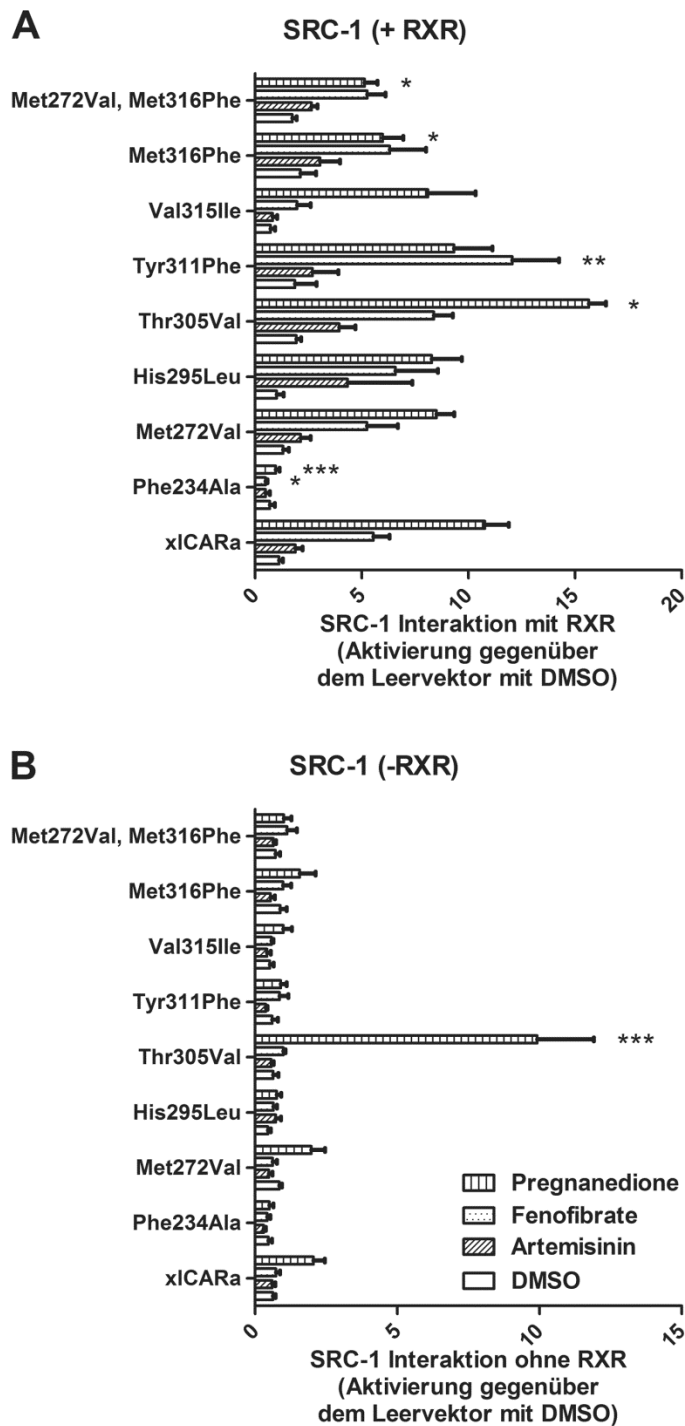


Bild 3.22: Basale und ligandenabhängige Interaktion von xICARa sowie xICARa-Mutanten mit dem Koaktivator SRC-1

Mammalian-two-hybrid-Versuche wurden in COS7-Zellen durchgeführt, welche mit Expressionsplasmiden für ein GAL4-DBD/SRC-1-Interaktionsdomäne Fusionsprotein sowie einem Expressionsplasmid, welches ein VP16-AD/xICARa-Fusionsprotein codiert, transfiziert wurden. Getestet wurde die konstitutive sowie ligandenabhängige Interaktionen von xICARa sowie den angegebenen Mutanten mit dem Kofaktor SRC-1 in Gegenwart und Abwesenheit von RXRa. Es wurden acht xICARa Mutanten mit drei Induktoren von xICARa behandelt: Artemisinin (100 μ M), Fenofibrat (10 μ M), Pregnandion (30 μ M). Die angegebenen Werte sind jeweils die normalisierten Aktivierungsfaktoren im Vergleich zum DMSO-behandelten Leervektor (Mittelwerte mit Standardfehler). Die Interaktion der beiden Fusionsproteine wurde über ein GAL4-abhängiges Promotorkonstrukt mit Luziferaseexpression gemessen. Statistisch signifikante Unterschiede mit einfaktorierter Varianzanalyse und Dunnett-Test gegen den Wildtyprezeptor induziert mit der jeweiligen Substanz sind mit Sternchen gekennzeichnet (***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$), $n = 4$.

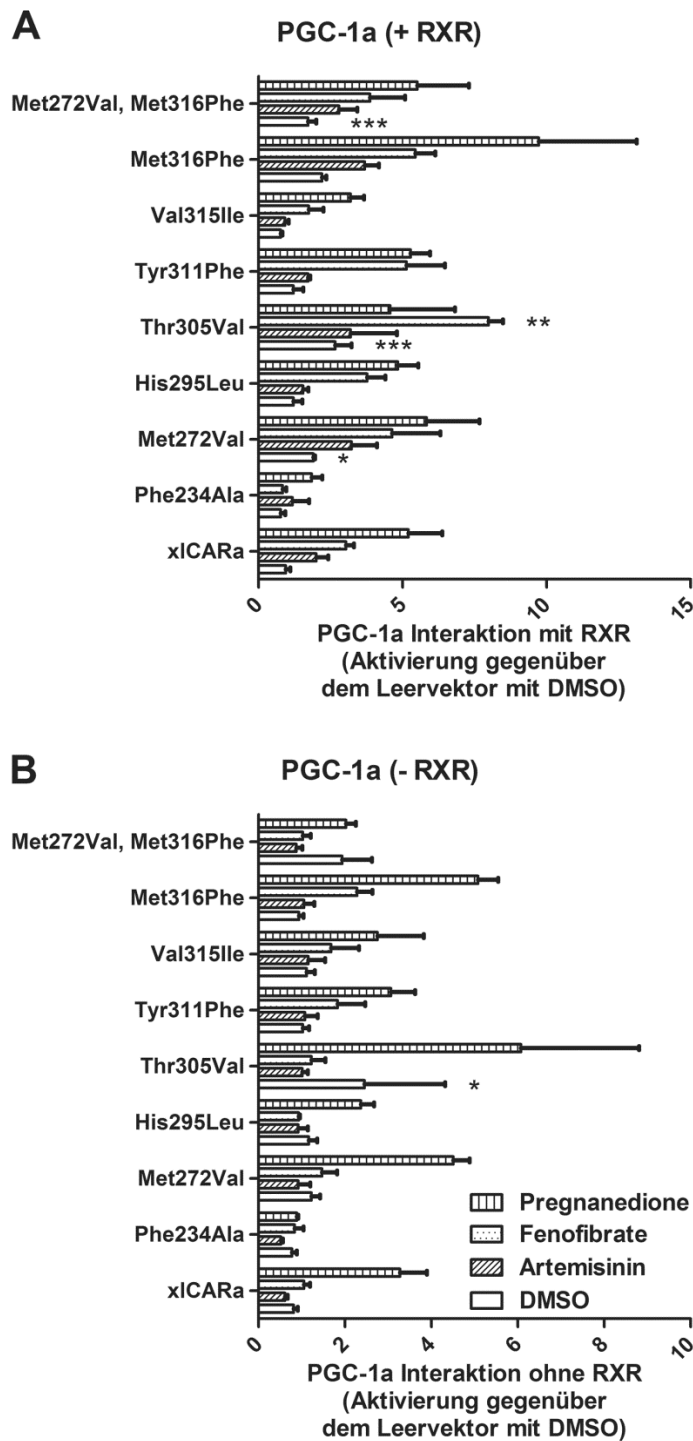


Bild 3.23: Basale und ligandenabhängige Interaktion von xICARa sowie xICARa-Mutanten mit dem Koaktivator PGC-1a

Mammalian-two-hybrid-Versuche wurden in COS7-Zellen durchgeführt, welche mit Expressionsplasmiden für ein GAL4-DBD/PGC-1a-Interaktionsdomäne-Fusionsprotein sowie einem Expressionsplasmid, welches ein VP16-AD/xICARa-Fusionsprotein codiert, transfiziert wurden. Getestet wurde die konstitutive sowie ligandenabhängige Interaktionen von xICARa sowie den angegebenen Mutanten mit dem Kofaktor PGC-1a in Gegenwart und Abwesenheit von RXRa. Es wurden acht xICARa-Mutanten mit drei Induktoren von xICARa behandelt: Artemisinin (100 μ M), Fenofibrat (10 μ M) und Pregnandion (30 μ M). Die angegebenen Werte sind jeweils die normalisierten Aktivierungsfaktoren im Vergleich zum Wildtyp-xICARa. Die Interaktion der beiden Fusionsproteine wurde über ein GAL4-abhängiges Promotorkonstrukt mit Luziferaseexpression gemessen. Statistisch signifikante Unterschiede mit einfaktorierter Varianzanalyse und Dunnett-Test gegen den Wildtyprezeptor induziert mit der jeweiligen Substanz sind mit Sternchen gekennzeichnet (***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$), $n=4$.

3.2.7 Hepatische und renale Zielgene von *Xenopus laevis* CAR

Zu den Zielgenen des humanen CAR gehören unter anderem Gene des Fremdstoffmetabolismus sowie des Energiestoffwechsels aber auch der Karzinogenese.

Zunächst wurde untersucht, ob Gene der Cyp3a Familie zu den Zielgenen der *Xenopus*-CAR gehören. Es wurden drei Cyp3a-Promotoren des *Xenopus tropicalis* in Reporter-genversuchen mit LS174T-Zellen untersucht. Es konnte weder eine basale Aktivität noch eine Induzierbarkeit der Cyp3a-Gene detektiert werden (Bild 3.24).

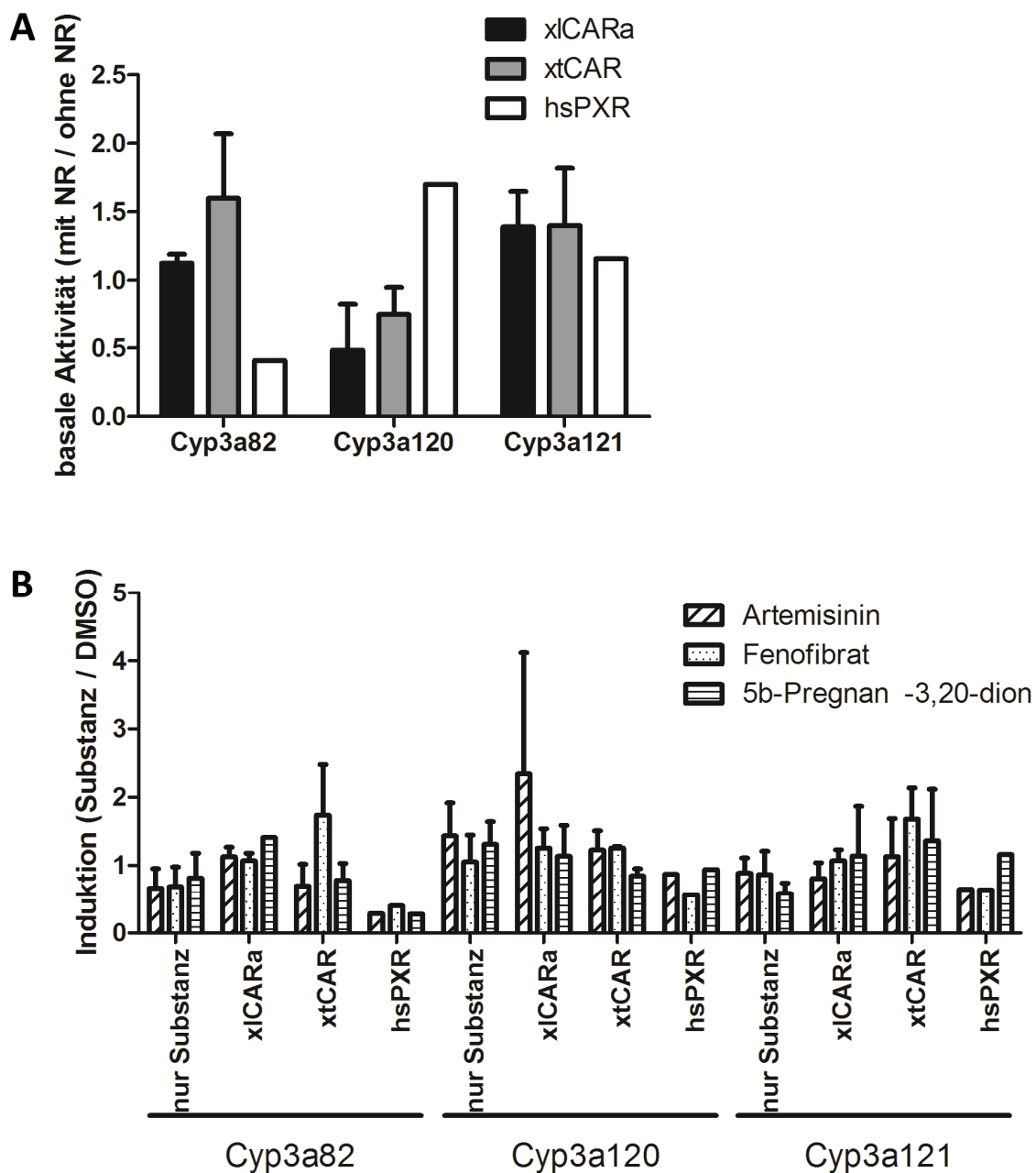


Bild 3.24: Cyp3a-Aktivität bei *Xenopus* in LS174T-Zellen

A Die basale Aktivität der *Xenopus*-Cyp3A sowie B die Induzierbarkeit der *Xenopus*-Cyp3a wurden mittels Reporter-genassay in LS174T-Zellen überprüft. Hierfür wurden die Promotoren der Gene Cyp3a82, Cyp3a120 sowie Cyp3a121 untersucht.

Um die physiologischen Zielgene der *Xenopus*-CAR zu identifizieren, wurden globale Genexpressionsprofile mit Microarrays untersucht. *Xenopus laevis* wurden mit zwei der identifizierten, strukturell unterschiedlichen xICAR-Aktivatoren (Artemisinin und Pregnandion) an 2 aufeinander folgenden Tagen induziert. Die Substanz-induzierten-Genexpressionsunterschiede wurden zwischen Fröschen, welche mit Lösungsmittel (DMSO) behandelten wurden und Fröschen, welche mit der jeweiligen Substanz behandelt wurden, bestimmt. Um falsch-positive Expressionsunterschiede über CAR-unabhängige Mechanismen zu minimieren, wurden nur Gene berücksichtigt, welche ähnlich durch beiden Liganden beeinflusst wurden. Als Schwellenwert wurden für die Genexpressionsänderungen in der Leber eine mindestens 2-fache Genexpressionsänderung durch den einen Liganden sowie eine mindestens 5-fache Genexpressionsänderung durch den anderen Liganden festgelegt. Diese Kriterien erfüllten 8 hoch- sowie 11 herunterregulierte Gene. Drei der acht induzierten Gene gehören zu den Genen der Phasen I bis III der Biotransformation: Slc16a, Gstp sowie Akr1c. Zu den gehemmten Genen gehören Glucose-6-phosphatase, Amylase, Chymotrypsin, Trypsin sowie Elastase. Die Expressionsunterschiede für Gstp sowie Slc16a wurden mittels qPCR bestätigt.

Tabelle 3.6: Genexpressionsunterschiede in der Leber von *Xenopus laevis* Weibchen, welche mit Artemisinin oder Pregnenolon behandelt wurden*.

Gen Symbol	Gen Name	UniGene ID	Artemisinin	Pregnenolon
SLC16A6	solute carrier family 16, member 6	XI.16655	3.0	19.9
GSTP1	Glutathione S-transferase P1	XI.54920	20.4	11.7
LOC443699	Transcobalamin II	XI.25998	4.0	7.2
PIM3	Pim3 oncogene	XI.23800	4.9	6.4
SLC1A5	solute carrier family 1, member 5	XI.75429	6.2	5.6
HIGD1ab	HIG1 hypoxia inducible	XI.25757	5.3	3.5
HSD15B5/AKR1C3	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 5	XI.14135	31.2	3.2
PTGS2/COX2	Cyclooxygenase 2	XI.78035	14.7	3.0
CPA1	carboxypeptidase A1	XI.73839	0.2	0.2
RAB11-FIP3	RAB11 family interacting protein 3	XI.3719	0.5	0.2
G6PC	Glucose-6-phosphatase	XI.5979	0.2	0.1
TRY	Trypsin	XI.18278	0.1	0.1
NAT	N-acetyltransferase	XI.14656	0.5	0.1
AMY2A	alpha-amylase 2A	XI.9243	0.1	0.1
CELA3B	chymotrypsin-like elastase 3B	XI.2956	0.1	0.1
CTRC	chymotrypsin C (caldecrin)	XI.23779	0.0	0.1
CELA1	chymotrypsin-like elastase 1	XI.3275	0.0	0.0
CELA3A	chymotrypsin-like elastase family 3A	XI.4030	0.0	0.0
LOC495461	MHC class II DR alpha	XI.4415	0.5	0.0

* Die Werte bezeichnen Unterschiede zur Versuchsgruppe, welche nur mit dem Lösungsmittel DMSO injiziert wurden. Die Tabelle beinhaltet Gene, deren Expression von beiden Stoffen ähnlich beeinflusst wurde und zwar mindestens 2-fach durch einen Aktivator und mindestens 5-fach durch den anderen.

Für die Genexpressionsänderungen in der Niere wurde eine 5-fache Genexpressionsänderung als Schwellenwert festgelegt, was für 32 induzierte Gene zutrifft. Am stärksten induziert sind Gene, welche für antimikrobielle Peptide codieren: Caerulein, Magainin sowie PGLa. Gene der Phase I-III der Biotransformation finden sich ebenfalls in der Liste: Cyp2j2, Cyp2c19, Gstp sowie Akr1c.

Die gesteigerte Expression der antimikrobiellen Peptide konnte mittels qPCR von K. Römer in Verlauf ihrer Diplomarbeit nicht für alle 3 Tiere, welche in der Gesamtexpressionsanalyse gemeinsam untersucht wurden, reproduziert werden. Eine Vergrößerung der Tierzahl auf 6 Tiere, welche mit DMSO bzw. Pregnenolon behandelt wurden, zeigte ebenfalls keine signifikante Induktion der antimikrobiellen Peptide.

Mittels qPCR konnte ebenfalls eine Expression der antimikrobiellen Peptide PGLa und Magainin in der Blase nachgewiesen werden.

Tabelle 3.7: Genexpressionsunterschiede in der Niere von *Xenopus laevis* Weibchen, welche mit Artemisinin oder Pregnenolon behandelt wurden*.

Gen Symbol	Gen Name	UniGene ID	Artemisinin	Pregnenolon
LOC397740	caerulein	XI.76006	9,7	124,1
LOC397766	magainin II copy E	XI.843	12,1	114,2
cae-a /// LOC397740	preprocaerulein /// caerulein	XI.76213	14,8	105,3
I14-A	lactose-binding lectin	XI.819	8,8	96,0
pgla-a	prepro-PGLa	XI.60323	19,1	91,1
cyp2j2 [Predicted: Source is Human Entrez Gene]	cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2 [Predicted: Source is Human Entrez Gene]	XI.74062	32,6	46,7
cyp2j2	cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2	XI.34192	22,2	26,5
pIgR	polymeric immunoglobulin receptor	XI.9494	19,8	25,2
MGC81892	MGC81892 protein	XI.76669	15,5	19,5
---	---	XI.73965	14,6	19,5
LOC495841	uncharacterized LOC495841	XI.79128	7,5	17,4
prtn3	proteinase 3	XI.49925	8,7	16,1
cyp2c19 [Predicted: Source is Human Entrez Gene]	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19 [Predicted: Source is Human Entrez Gene]	XI.71344	11,6	14,9
LOC398340	Ig H-chain (V-D-J-C)	XI.1225	6,4	13,3
---	serine protease 27-like (<i>Xenopus tropicalis</i>)	---	7,0	12,8
igj	immunoglobulin J polypeptide, linker	XI.261	8,8	12,6

Gen Symbol	Gen Name	UniGene ID	Artemisinin	Pregnenolone
	protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides			
emx2	empty spiracles homeobox 2	XI.2908	5,5	9,7
trmt11	tRNA methyltransferase 1 homolog (S. cerevisiae)-like	XI.5053	11,3	9,4
LOC594870	immunoglobulin light chain type III	XI.21593	11,0	9,2
---	uncharacterized LOC100127269	XI.70513	7,9	8,9
LOC443699	uncharacterized LOC443699	XI.25998	5,1	7,9
---	mucin-2-like (<i>Xenopus tropicalis</i>)	XI.25032	8,4	7,7
---	---	XI.10777	5,1	7,3
gstp1	Glutathione S-transferase pi 1	XI.54920	9,3	7,0
---	C-reactive protein, pentraxin-related (<i>Xenopus tropicalis</i>)	XI.9352	5,2	6,9
MGC81121	MGC81121 protein	XI.11640	6,1	6,5
pgr-a	progesterone receptor	XI.727	5,9	6,3
LOC779021	Uncharacterized LOC779021	XI.58043	5,3	6,3
MGC82879	MGC82879 protein	XI.47606	5,2	6,2
igl@ /// iglv5-48 /// LOC594870	immunoglobulin lambda locus /// immunoglobulin lambda variable 5-48 (non-functional) /// immunoglobulin light chain type III	XI.4773	5,4	6,0
post.2	posterior protein, gene 2	XI.16656	7,4	5,6
akr1cl1	aldo-keto reductase family 1, member C-like 1	XI.81228	5,9	5,2

* Die Werte bezeichnen Unterschiede zur Versuchsgruppe, welche nur mit dem Lösungsmittel injiziert wurden. Die Tabelle beinhaltet Gene, deren Expression von beiden Stoffen ähnlich beeinflusst wurde und zwar mindestens 5-fach durch beide Aktivatoren.

4 Diskussion

4.1 Generationsübergreifende Genexpressionsveränderungen nach einmaligem Fremdstoffkontakt

In dieser Arbeit wurden Liganden der nukleären Rezeptoren CAR und PXR auf dauerhafte sowie generationsübergreifende Nebenwirkungen getestet, welche durch eine Fremdstoffexposition der Mutter bereits vor der Schwangerschaft hervorgerufen werden. Im Folgenden werden die CAR (Abschnitt 4.1.1) bzw. PXR (Abschnitt 4.1.2) vermittelten Effekte sowie deren klinische Relevanz diskutiert.

4.1.1 CAR-vermittelte maternale Vererbung der Kapazität des Fremdstoffmetabolismus

Untersucht wurde der Einfluss des murinen CAR-Liganden TCPOBOP auf dauerhafte und generationsübergreifende Veränderungen der Genexpression. Die von Chen et al. (2012) gezeigte anhaltende Cyp2b10-Induktion nach neonataler TCPOBOP-Exposition konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Die schwächeren dauerhaften Veränderungen der Cyp2c37-Expression wurden nicht bestätigt. Durch eine vollständige RNA-Sequenzierung wurden weitere verändert exprimierte Gene identifiziert. Signalweg-Analysen ergaben, dass diese Gene eine Rolle im Medikamentenstoffwechsel aber auch im Lipidstoffwechsel spielen und in die Leberproliferation involviert sind. Diese Ergebnisse passen zu den für CAR bereits beschriebenen CAR-Zielgenen in den Phasen I bis III des Fremdstoffmetabolismus (vgl. Abschnitt 1.2) sowie zu den endogenen Funktionen Energiestoffwechsel sowie bei der Entstehung von Leberkrebs (vgl. Abschnitt 1.4).

In dieser Arbeit konnte darüber hinaus zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine veränderte Cyp2b10-Genexpression multigenerational an die F₁-Generation weitergegeben wurde. Die Nachkommen von Müttern, welche im Alter von 3 Tagen einmalig mit TCPOBOP behandelt wurden, hatten eine 100-fach veränderte Cyp2b10-Genexpression gegenüber den Kontrolltieren, die auch bei den erwachsenen Mäusen noch erhöht war. Die relative Cyp2b10-Genexpressionsänderung bei adulten Weibchen fällt wahrscheinlich nur deswegen geringer aus, weil die Cyp2b10-Genexpression in der Leber bei diesem Geschlecht mit dem Alter physiologisch zunimmt (Jarukamjorn *et al.*, 2006; Jarukamjorn *et al.*, 1999; Ledda-Columbano *et al.*, 2003). Die RNA-Sequenzierung zeigte für Proben von neugeborener F₁-Mäuse sowie von Adulttieren ebenfalls eine veränderte Expression von Genen, deren Produkte eine Rolle im Fremdstoffmetabolismus haben. Bei einer

Signalweg-Analyse konnten außerdem veränderte Genexpressionen bei F₁-Adulttieren von Genen, deren Produkte eine Rolle im Fett- und Fettsäuremetabolismus sowie bei Immunkrankheiten spielen, gefunden werden. Diese Befunde aus der F₁-Generation passen ebenfalls zu den beschriebenen Folgen nach chronischer Aktivierung von CAR im Energiestoffwechsel (vgl. Abschnitt 1.4). Eine Funktion bei Immunreaktionen wurde bisher lediglich für PXR beschrieben (vgl. Abschnitt 1.4). Es ist jedoch vorstellbar, dass auch dies eine überlappende Funktion von CAR und PXR ist.

Neb1, welches neben Cyp2b10 als einziges Gen ebenfalls in der F₀-Generation sowie der F₁-Generation bei Neugeborenen sowie Adulttieren induziert ist, wurde auch nach einer 4-wöchigen Dauertherapie mit Phenobarbital bei Mäusen als am drittstärksten induziertes Gen detektiert. Die Funktion des als herzspezifisch beschriebenen Muskelproteins in der Leber ist bislang nicht bekannt (Lempiäinen *et al.*, 2011).

Wie in der Einleitung (Abschnitt 1.5) beschrieben, wurden als Ursache für die dauerhaften Veränderungen in der F₀-Generation bereits stabile epigenetische Veränderungen an den Promotorregionen der regulierten Gene (Chen *et al.*, 2012; Lempiäinen *et al.*, 2011) sowie ein Fremdstoffdepot lipophiler Substanzen im Fettgewebe vorgeschlagen (Poland *et al.*, 1980; Smith *et al.*, 1993). Die Anzahl der im Vergleich zur Kontrollgruppe unterschiedlich exprimierten Gene nimmt nach TCPOBOP-Injektion erst bei Adulttieren der F₁-Generation abrupt ab, dies könnte dem Verbrauch des TCPOBOP-Depots im Fettgewebe entsprechen. Was nicht unbedingt für den Effekt eines Depots spricht ist, dass mit der Ausnahme von Cyp2b10 und Neb1 die differentiell exprimierten Gene zwischen den Versuchsgruppen unterschiedlichen Alters bzw. zwischen den Generationen nicht überlappen. Eine mögliche Erklärung ist, dass die durch einmalige Exposition mit TCPOBOP aktivierten oder reprimierten Gene wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren mit einer zeitlichen Verzögerung die Expression weiterer Gene beeinflussen. Vorhandenes TCPOBOP aus einem Depot müsste dagegen die Expression der CAR-Zielgene andauernd induzieren. Andererseits könnte die chronische Exposition mit TCPOBOP manche Gene nur zu spezifischen Zeitpunkten aktivieren. Eine zeitabhängige Heterogenität der CAR-vermittelten Effekte bei chronischer Therapie mit CAR-Liganden wird am Beispiel der Fettleber deutlich. Nach kurzzeitiger Exposition mit CAR-Induktoren wurde die Entstehung einer Fettleber beobachtet, nach Langzeittherapien wurden Verbesserungen der Fettleber beschrieben (vgl. Abschnitt 1.4). Was ebenfalls eher gegen eine Akkumulation von TCPOBOP im Fettgewebe spricht ist, dass nicht alle CAR-Zielgene dauerhaft aktiviert werden. Die direkte Induktion der Cyp3a11-Genexpression ist drei Monate nach TCPOBOP-Injektion nicht mehr vorhanden. Dies könnte wiederum auch durch sekundäre inhibitorische Effekte erklärt werden.

Der Mechanismus dieser dauerhaften sowie multigenerationalen Weitergabe der Veränderungen im Fremdstoffmetabolismus bleibt somit bislang ungeklärt. Eine langsame Abgabe von TCPOBOP aus einem Depot könnte die Genexpression der Folgegeneration durch direkte Exposition der Zygote und den folgenden Entwicklungsstadien beeinflussen, oder aber die epigenetische Ausstattung der Vorläuferkeimzellen oder Keimzellen selbst verändern. Für eine maternale Vererbung kommt ebenfalls die Weitergabe des Fremdstoffes durch die Muttermilch in Frage (Ho and Burggren, 2010). Medizinisch relevant ist eine von Medikamenten abhängige Übertragung der Enzyminduktion in die Folgegeneration unabhängig vom zugrundeliegenden Mechanismus. Zudem könnten verschiedene generationsübergreifend wirkende Induktoren unterschiedliche Übertragungsmechanismen haben.

Fragestellungen zum Übertragungsmechanismus können mittels In-vitro-Fertilisation geklärt werden. Oozyten aus induzierten Spendermüttern könnten in uninduzierte Leihmütter überführt werden und umgekehrt. Falls ein TCPOBOP-Depot im Körper der Mutter relevant für die generationsübergreifenden Genexpressionsänderungen bei F₁-Tieren ist, hätten Nachkommen von uninduzierten Mäusen, welche von TCPOBOP-behandelten Leihmüttern ausgetragen wurden, eine gesteigerte Cyp2b10-Genexpression. Falls die Vorläuferkeimzellen oder Keimzellen selbst epigenetische Veränderungen tragen, welche zu einer gesteigerten Cyp2b10-Genexpressionsänderung in der F₁-Generation führen, hätten Nachkommen induzierter Mäuse, welche von uninduzierten Leihmüttern ausgetragen werden, eine gesteigerte Cyp2b10-Genexpression.

Ob Cyp2b10-induzierende TCPOBOP-Effekte durch die TCPOBOP-Weitergabe in der Muttermilch an die nächste Generation entstehen, kann überprüft werden, indem von uninduzierten Müttern durch Kaiserschnitt geborene F₁-Tiere von induzierten Leihmüttern gesäugt werden und umgekehrt.

Bisher konnte keine Übertragung der Cyp2b10-Induktion über die paternale Linie gezeigt werden. Entweder findet die Übertragung nur über die maternale Linie statt, oder die Exposition von Tieren im Alter von 3 Tagen ist zu früh, um eine paternale Übertragung auszulösen. Im Alter von 3 Tagen sind bei männlichen Mäusen lediglich Spermatogonien vorhanden. Eine Exposition von Zellen aus allen Stadien der Spermatogenese, die bei Mäusen 34 Tage dauert (Dass *et al.*, 2007), wäre informativer.

Für die in der Literatur beschriebenen transgenerationalen Effekte von Umweltgiften, die zum Teil wie Bisphenol-A auch beschriebene CAR-Liganden sind, ist ebenfalls noch kein Mechanismus beschrieben (vgl. Abschnitt 1.6). Die Aufklärung von Mechanismen der CAR-vermittelten multigenerationalen Transmission von Genexpressionsänderungen, könnte folglich auch im Bereich der Toxikologie neue Erkenntnisse für die Risikobewertung von Umweltgiften bringen.

Unabhängig von dem zugrunde liegenden Mechanismus liegen die Genexpressionsänderungen, verglichen mit dem Haushaltsgen *Gapdh*, auf einem Niveau, auf dem funktionelle Konsequenzen denkbar sind. Zu zeigen bleibt im Anschluss an diese Arbeit zunächst eine veränderte Expression auf der biologisch aktiven Proteinebene sowie veränderte Aktivitäten der am Fremdstoffmetabolismus beteiligten Enzyme bzw. eine veränderte Elimination von Medikamenten bei zuvor mit Fremdstoffen exponierten Tieren. So könnten phänotypische Konsequenzen direkter abgeleitet werden.

4.1.2 PXR-vermittelter generationsübergreifender Einfluss auf die Genexpression

Bisher wurden keine PXR-vermittelten dauerhaften Genexpressionsänderungen untersucht. Die differentiell exprimierte Gene nach PCN-Exposition wurden im Verlauf dieser Arbeit anhand einer Hochdurchsatz-RNA-Sequenzierung bestimmt. Diese zeigte eine 3600-fache Verminderung der *Amd1/2* Expression drei Monate nach neonataler PCN-Injektion. *Amd1/2* codiert für eine Adenosylmethionin Decarboxylase, welche die Decarboxylierung von S-Adenosylmethionin katalysiert. Tabassum *et al.* korrelierten einen Polymorphismus in *AMD1* mit Adipositas bei Kindern (Tabassum *et al.*, 2012). Die Signalweg-Analyse zeigt auch Gene, deren differentiell exprimierte Produkte bei einer Lebernekrose reguliert sind. In der F₁-Generation sind Gene, welche in Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom gebracht werden können, differentiell exprimiert. Bei neugeborenen Mäusen ist *Dio2* nach maternaler PCN-Exposition 14-fach stärker exprimiert. Passend zu diesem Ergebnis ist eine *Dio2*-Induktion in einer Studie, in der eine PCN-Exposition Mäuse vor Adipositas und Insulinresistenz durch fettreiche Diät schützt. *Dio2* soll den Energieverbrauch im braunen Fettgewebe erhöhen (Ma and Liu, 2012). In weiteren Studien mit *Dio2*^{-/-}-Knockout-Mäusen wurden deren Insulinresistenz, Glukoseintoleranz, Fettleber sowie eine höhere Prävalenz von Adipositas bei fettreicher Diät zutage gebracht (Castillo *et al.*, 2011; Marsili *et al.*, 2011).

Adulttiere haben im Vergleich zur Kontrollgruppe eine 16-fach erhöhte *Saa3*-Expression sowie 3264-fach verminderte *Amd1/2*- und 81-fach verminderte *Mup5*-Expression. *Saa3* codiert für ein Apolipoprotein, welches mit Lipoproteinen hoher Dichte (HDL) assoziiert ist (Benditt and Eriksen, 1977; Benditt *et al.*, 1979). *Mup5*, ein Protein zum Transport lipophiler Substanzen, wird ebenfalls bei Ernährungsmangel reprimiert (Giller *et al.*, 2013). Die Analyse der differentiell regulierten Signalwege zeigte bei neugeborenen sowie adulten F₁-Mäusen außerdem veränderte Genexpressionen, welche zu Lebernekrosen führen können und bei adulten Mäusen zu einer differentiellen Expression von Genen, deren Produkte an Entzündungsreaktion beteiligt sind.

Zusammengefasst treten bei maternaler PCN-Exposition Genexpressionsänderungen auf, die den Energiestoffwechsel und damit Krankheiten beeinflussen, welche mit dem

metabolischen Syndrom assoziiert sind. In epidemiologischen Studien vor allem an Kindern, die während der Hungersnöte im Winter 1945 in den Niederlanden („Dutch Hunger Winter“) ausgetragen wurden aber auch in Versuchen mit Ratten und Mäusen wurde bereits gezeigt, dass Veränderungen im Energiestoffwechsel sowie Dispositionen für metabolische Krankheiten wie Diabetes an die nächste Generation übertragen werden können (vgl. Abschnitt 1.6).

Die phänotypischen Auswirkungen der PCN-vermittelten Genexpressionsänderungen bleiben noch zu untersuchen. Herauszufinden ist, ob eine PXR-vermittelte Genexpressionsänderung den Gesundheitszustand der nachfolgenden Generation beeinflusst. Ob dies pharmakologisch genutzt werden kann oder ob die F₁-Generation je nach Exposition der Mutter und zwar bereits vor der Schwangerschaft bestimmte Prädispositionen für Krankheiten zeigt, bleibt zu untersuchen.

Im Vergleich zu TCPOBOP nehmen nach PCN-Injektion die differentiell exprimierten Gene im Verlauf der Zeit kontinuierlich ab. Dies könnte durch kontinuierliche epigenetische Veränderungen an den Promotorregionen der einzelnen Gene und sekundären Effekten auf andere Gene in den aufeinanderfolgenden Versuchsgruppen verschiedenen Alters und unterschiedlicher Generationen zurückzuführen sein. Denn auch nach PCN-Injektion überlappen die differentiell exprimierten Gene zwischen den Versuchsgruppen nicht. Auffällig ist, dass PCN zunächst nach direkter Induktion über doppelt so viele Gene reguliert wie CAR. Dies könnte auf ein breiteres Spektrum an physiologischen Funktionen hindeuten, die sich aus dem breiteren Substratspektrum von PXR ergeben könnten.

4.1.3 Klinische Relevanz

Bei mehr als 1,7 Millionen hospitalisierten Patienten wurden 2008 in den USA unerwünschte Wirkungen von Medikamenten notiert (Lucado *et al.*, 2011). 2001 wurde in einer Studie aus Norwegen gezeigt, dass 18% der verstorbenen und zuvor hospitalisierten Patienten an unerwünschten Arzneimittelwirkungen verstarben. Bei anderen Patienten verursachen unerwünschte Wirkungen erhebliche Begleiterkrankungen, die mit der Anzahl an eingenommenen Medikamenten drastisch ansteigen (Buajordet *et al.*, 2001). Am häufigsten sind akute Nebenwirkungen wie Hautausschläge und gastrointestinale Beschwerden, die innerhalb weniger Minuten bis Wochen nach Therapiebeginn auftreten. Später auftretende Nebenwirkungen sind schwerer zu erfassen, doch konnten z.B. sekundäre Leukämien mit Etoposidtherapie (Ezoe, 2012) oder Kardiotoxizität mit Doxorubicintherapie (Sawyer, 2013; van Dalen *et al.*, 2011) in Verbindung gebracht werden. Zeitlich noch weiter verzögert sind unerwünschte Wirkungen nach intrauteriner Exposition, welche sich erst im Verlauf des Lebens manifestieren. Ein Beispiel hierfür ist

die intrauterine Exposition mit Glukokortikoiden, welche sich im Verlauf des Lebens als Bluthochdruck, gestörte Glukosetoleranz und Verhaltensauffälligkeiten manifestiert (Drake *et al.*, 2007).

Da Erwachsene im Verlauf ihres Lebens wesentlich mehr Kontakt zu Fremdstoffen haben als Neugeborene, sind phänotypische Veränderungen in der nachfolgenden Generation nach Fremdstoffexposition von Erwachsenen medizinisch besonders relevant.

Auch weibliche Mäuse, die erst im Erwachsenenalter mit TCPOBOP behandelt wurden, übermittelten auf die F₁-Nachkommen eine über 500-fach gesteigerte Cyp2b10-Expression.

In dieser Arbeit wurden Liganden der nukleären Rezeptoren CAR sowie PXR auf generationsübergreifende Nebenwirkungen getestet, welche durch eine Exposition der Mutter bereits vor der Schwangerschaft hervorgerufen werden. Es wurden unter anderem Veränderungen des Fremdstoffwechsels und der Energiehomöostase in der nächsten Generation hervorgerufen. Bisher sind klinische Studien zur Risikobewertung von Medikamenten jedoch nicht generationsübergreifend angelegt. In Zukunft könnten generationsübergreifende Risikobewertungen für viel mehr Medikamente notwendig werden (Mirbahai and Chipman, 2013). Dies könnte dazu beitragen, die inter- und intra-individuellen Unterschiede in der Pharmakokinetik vieler Medikamente zu reduzieren. Bis jetzt wurden lediglich Folgen einer Exposition des Fötus im Mutterleib während der Schwangerschaft, sowie Konsequenzen für die F₁-Generation durch Keimbahnmutationen, wie sie von Chemotherapeutika verursacht werden, untersucht.

Weitere Studien an humanisierten CAR- und PXR-Mäusen, CAR- und PXR-Knockout-Mäusen sowie Patienten sind nötig, um gebräuchliche Medikamente auf dauerhafte Nebenwirkungen bei Eltern und deren Kindern zu untersuchen. Weiterführend könnten Untersuchungen zu generationsübergreifenden Effekten von äußeren Einflüssen zur Aufklärung von Prädisposition für bestimmte Krankheiten beitragen (Guerrero-Bosagna and Skinner, 2012). Derzeit wird bereits nach epigenetischen Grundlagen für die stetig steigende Prävalenz von Adipositas sowie Diabetes gesucht. Korrelierende Biomarker müssen noch etabliert werden (Skinner *et al.*, 2010). So könnte eine frühzeitige oder sogar präventive medizinische Intervention möglich gemacht werden.

4.2 CAR des *Xenopus laevis* ist strukturell und funktionell analog zum humanen PXR

Im Verlauf dieser Arbeit wurden die CAR-Rezeptoren der Amphibien (*Xenopus tropicalis*, *Xenopus laevis*) und Reptilien (*Anolis carolinensis*) funktionell charakterisiert. Vergleiche zwischen Tierarten ermöglichen ein besseres Verständnis von humanen Proteinen. Die Proteinstruktur in Zusammenhang mit der Funktion von nukleären Rezeptoren zu bringen, ermöglicht die Identifizierung von Liganden und trägt dazu bei, deren Aktivität und Nebenwirkungen besser vorhersagen zu können.

In letzter Zeit sind die Populationen von Amphibienarten unerwartet stark geschrumpft oder ausgestorben. Laut der IUCN Roten Liste (Version 2012.2) sind weltweit etwa ein Drittel der Amphibien bedroht oder ausgestorben, mit steigender Tendenz (Bild 4.1).

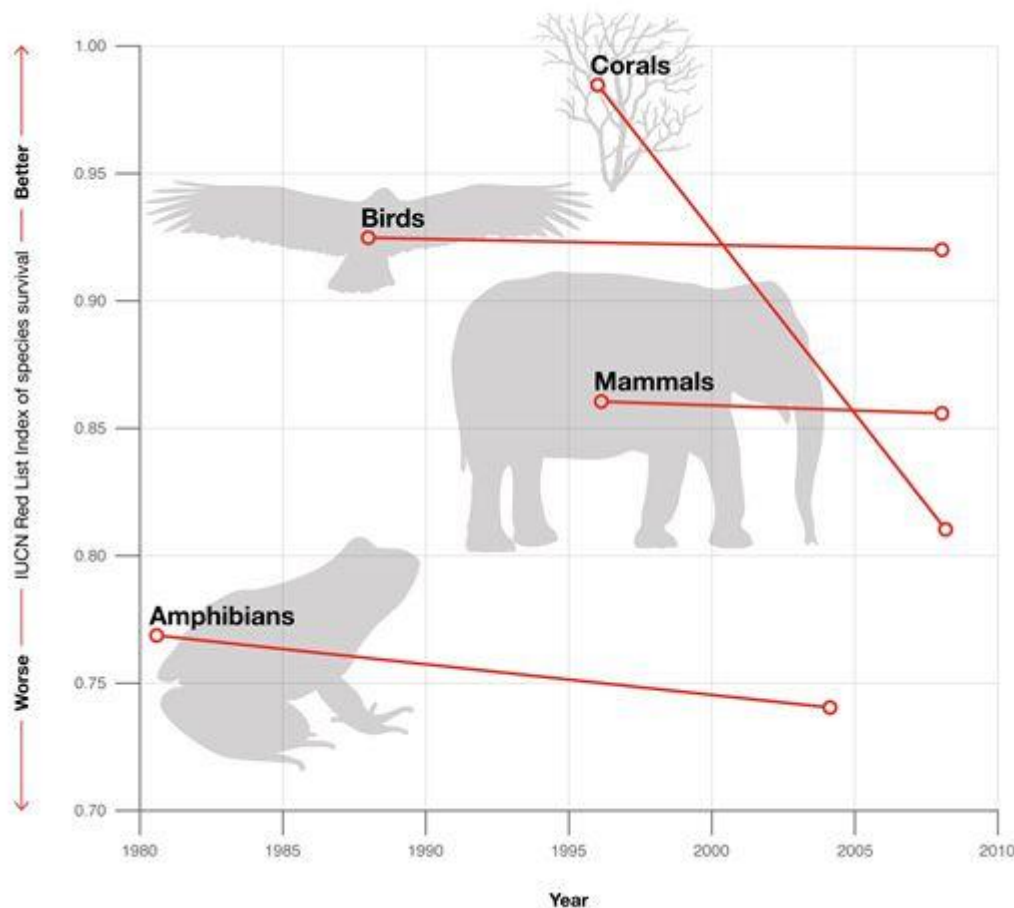


Bild 4.1: IUCN Red List Index für Riffkorallen, Vögel, Säugetiere sowie Amphibien.

Nach dem IUCN Red List Index (RLI) sind die Amphibien im Durchschnitt die bedrohteste Gruppe. Ein RLI von 1 entspricht Arten, die in naher Zukunft wahrscheinlich nicht aussterben (*least concern*). Ein RLI von 0 entspricht allen ausgestorbenen Arten. (erhältlich im Internet unter: <http://www.iucnredlist.org/about/summary-statistics> [Stand: Mai 2013])

Wegen ihrer aquatischen Lebensweise sowie ihrer dünnen, durchlässigen Haut, die sogar als Respirationsorgan dient, sind Amphibien in einem besonders direkten Kontakt und Austausch mit ihrer Umwelt. Ein Fremdstoffrezeptor mit einem breiten Ligandenspektrum war bisher allerdings nicht beschrieben. Im Verlauf dieser Arbeit wurde das CAR der Amphibien als analog zum humanen PXR charakterisiert. Dies bietet ferner eine Möglichkeit den Einfluss von Xenobiotika auf die Genexpression der Amphibien in Zellkulturversuchen auf molekularer Ebene zu untersuchen sowie gezielt den Fremdstoffmetabolismus durch Substanzen zu stimulieren.

4.2.1 Proteinstruktur

Die CAR-Gene der Reptilien und Amphibien codieren im Vergleich zum humanen Rezeptor für längere Proteine. Der Längenunterschied betrifft vor allem die Sequenzbereiche zwischen Helix 1 und Helix 3 sowie die N-terminalen Bereiche. Die Proteinstruktur der CAR der Sauropsida und Amphibien ähneln der des humanen PXR sowie des humanen VDR, welche ebenfalls eine längere Sequenz zwischen Helix 1 und Helix 3 besitzen. Diese Sequenzen sind nicht homolog, weder in der Länge noch in der Sequenz sondern nur in ihrer Position. Diese Kategorie der intrinsischen Unordnung wird als „flexible disorder“ bezeichnet (Bellay *et al.*, 2011). Ähnlich dem humanen PXR sowie VDR haben CAR der Reptilien und Vögel eine hohe intrinsische Unordnung in diesem Bereich. CAR der Reptilien weist, trotz ebenfalls hoher basaler Aktivität, keine langen ungeordneten Aminosäuresequenzen auf. Eine Deletion des Indel-Bereichs zwischen H1 und H3 des xICARa hat wie im Verlauf dieser Arbeit gezeigt wurde keinen Einfluss auf die basale Aktivität oder Induzierbarkeit des Rezeptors. Eine Deletion aus dem humanen sowie *Xenopus*-VDR hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Induzierbarkeit dieser Rezeptoren (Krasowski *et al.*, 2011a). Im Gegensatz dazu, wie es im Verlauf dieser Arbeit gezeigt wurde, verliert der humane PXR durch die Deletion des Indels seine Funktion. Im humanen PXR bildet diese interhelikale Domäne zwischen Helix 1 und Helix 3 zwei zusätzliche β -Faltblätter: $\beta 1$ und $\beta 1'$, welche Teil der flexiblen Ligandenbindetasche sind (Watkins *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2013). Für VDR sowie CAR bleibt die Funktion dieses Indels offen. VDR, welcher ein sehr spezifisches Ligandenspektrum hat, besitzt eine interhelikale Domäne von vergleichbarer Länge wie PXR. Im Gegensatz dazu ist die Splice-Variante SV2 durch viele Liganden induzierbar, besitzt aber wie CAR1 keine interhelikale Domäne. Die funktionellen Unterschiede der untersuchten nukleären Rezeptoren in der basalen Aktivität sowie ihrer Induzierbarkeit durch Liganden lassen sich nicht durch die Unterschiede im Bereich zwischen H1 und H3 erklären und unterscheiden sich von PXR. Die niedrige Konservierungsrate der Aminosäuresequenz im Bereich des Indels könnte Folge der intrinsischen Unordnung sein. Intrinsisch ungeordnete Bereiche könnten schneller evolvieren als kompakte, interagierende Proteinstrukturen (Buchner,

2005). Dieser fehlende Selektionsdruck auf die Aminosäuresequenz muss nicht bedeuten, dass die Sequenz keine Funktion hat. Mögliche Funktionen wären bei der Interaktion mit noch unbekanntem Liganden oder mit Kofaktoren sowie mit zellulären Strukturen wie der Zellmembran.

4.2.2 Determinanten der basalen Aktivität

CAR der Amphibien mit seiner niedrigen basalen Aktivität und seiner starken Induzierbarkeit durch Liganden steht im Kontrast zu dem humanen Rezeptor sowie dem der Sauropsida. Humaner sowie Sauropsida-CAR sind konstitutiv aktiv und durch Liganden nur schwach induzierbar.

Das Homologiemodell für xlCARa von Dr. B. Windshügel zeigt zwischen Helix 9/10 und Helix 12 genau wie die Kristallstrukturen von PXR eine flexible Schleife. Dieser Unterschied zum humanen CAR konnte experimentell bestätigt werden. Hierfür wurden Prolinmutanten des hsCAR sowie der xlCARa hergestellt. Prolin ist eine sekundäre Aminosäure mit heterozyklischem Rest, welche keine Wasserstoffbrücken ausbilden kann und aufgrund seiner Winkelkonfiguration keine α -Helix bildet. Deswegen wird Prolin auch als „Helixbrecher“ oder „Strukturbrecher“ bezeichnet. Der Aminosäureaustausch in der Helix 11' des humanen CAR von Alanin zu Prolin zerstörte vermutlich die α -helikale Struktur. Das Aufbrechen der H11' könnte folglich die Helix 12 aus der aktiven Konformation gelöst haben. Die basale Aktivität wurde um die Hälfte verringert, was die Relevanz der Helix 11' für das humane CAR bestätigt. *Xenopus*-CAR hat im Homologiemodell zwischen Helix 9/10 und Helix 12 keine helikale Sekundärstruktur, die basale Aktivität veränderte sich durch Ersetzen von Asparagin durch Prolin nicht, was die Zuverlässigkeit des Homologiemodells bekräftigt.

Der Bereich zwischen Helix 9/10 und Helix 12 ist bei xlCARa 8 Aminosäuren lang, zwei Aminosäuren länger als der des humanen CAR. Verlängerung dieser humanen Aminosäuresequenz um zwei Aminosäuren sowie Deletion von 2 Aminosäuren aus dem Bereich zwischen Helix 9/10 und Helix 12 des xlCARa führten jeweils zu einer verminderten basalen Aktivität sowie Induzierbarkeit der Rezeptoren durch Liganden. Dies bestätigt wiederum die Relevanz der Helix 11' für die hohe basale Aktivität des humanen CAR. Der Bereich zwischen Helix 9/10 und Helix 12 ist auch bei xlCARa relevant für die aktive Position der Helix 12 und führt bei Verkürzung nicht zu einer erhöhten basalen Aktivität sondern verhindert die aktive Konformation der Helix 12.

Ein entscheidender Faktor für die basale Aktivität ist die regulierte, intrazelluläre Lokalisation des Rezeptors. Nach Transfektion liegen hsCAR und xlCARa beide im Zellkern vor, trotzdem ist hsCAR basal aktiv und xlCARa nicht. Eine Lokalisation im

Zytoplasma und eine daraus resultierende niedrige basale Aktivität treffen auf xlCARa demnach nicht zu. Die beiden Rezeptoren sind nach in vitro Expression sowie in Zellen gleich stark exprimiert, was mittels Westernblot und FACS-Analyse im Verlauf dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Dies macht xlCARa zu einem guten Modell, um die Aktivierung von CAR durch Liganden unabhängig von der Translokation im Zellkulturmodell zu testen.

4.2.3 *Xenopus laevis*-CAR als Xenosensor

PXR nimmt bei Amphibien eine Rolle außerhalb des Fremdstoffmetabolismus ein. Bei Amphibien übernimmt CAR die Rolle des Xenosensors. *Xenopus*-CAR hat genau wie PXR der Säugetiere ein breites Substratspektrum. Unter den Aktivatoren des *Xenopus*-CAR befinden sich sowohl Aktivatoren des CAR der Säugetiere wie Artemisinin oder SR12813 aber auch Aktivatoren des PXR der Säugetiere wie Steroidhormone und ihre Vorstufen.

Progesteron aktivierte xlCARa im Reporter-genversuch ca. 40-fach. Dies war unter den 28 Substanzen die größte gemessene Expressionsänderung. Progesteron hat außerdem den niedrigsten EC₅₀-Wert von 0,1 µM. Die starke Aktivierbarkeit durch Steroidhormone und deren Vorstufen sowie die Expression von xlCARa in Eierstöcken und Hoden (Mathäs *et al.*, 2012) weisen auf eine zusätzliche Funktion des Rezeptors im Sexualhormonhaushalt hin.

Das breite PXR-ähnliche Substratspektrum der Amphibien-CAR könnte sekundär entstanden sein, um den Verlust des Xenosensors BXR auszugleichen, welcher eine Rolle außerhalb des Fremdstoffmetabolismus eingenommen hat (Blumberg *et al.*, 1998; Heath *et al.*, 2000; Grün *et al.*, 2002). Humanes PXR und xlCAR scheinen ein Beispiel für die konvergente Evolution zweier funktionell ähnlicher Proteine aus einem ancestralen Gen zu sein. Die Entstehung von CAR mit hoher basaler Aktivität auf der Linie der Amniota nach der Abspaltung der Amphibien ist eine parsimonische Hypothese. Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.6.3 unterstützen diese Hypothese, da eine hohe basale Aktivität des *Xenopus*-CAR durch Mutation von nur einer Aminosäure erzeugt werden kann.

Möglicherweise ist die Splice-Variante SV2 des humanen CAR die ancestrale Variante des humanen CAR gewesen. Sie ist ebenfalls durch Liganden induzierbar. Die basal-aktive Wildtyp-CAR-Variante könnte sekundär zur Regulation von endogenen Stoffwechselfunktionen entstanden sein. Diese Erkenntnisse könnten einen Beitrag zur selektiven Zielgenmodulation durch selektive Aktivierung einzelner Splice-Varianten des humanen CAR beitragen. Pharmakologisch interessant wäre es, den Medikamentenstoffwechsel unabhängig von endogenen Stoffwechselwegen wie dem Energiestoffwechsel induzieren zu könnten. Desweiteren schreiben sie der Splice-Variante

SV2 eine größere Bedeutung bei der Entwicklung und Sicherheitsbewertung neuer Medikamente zu.

Um ein besseres Verständnis über die Evolution der Proteinfunktionen von *Xenopus*-CAR sowie humanem CAR zu bekommen, wurden in dieser Arbeit insgesamt 13 humanisierende Mutanten des xICARa beschrieben. Mutationen zu den jeweils homologen Aminosäuren des humanen Rezeptors erlauben nicht nur die Analyse der Unterschiede zwischen humanem CAR und *Xenopus*-CAR, sondern sind auch gegenüber der konventionellen Alaninmutante vorteilhaft, weil der kleine Aminosäurerest von Alanin möglicherweise unerwünschte und unberechenbare Umlagerungen der benachbarten Aminosäuren der Ligandenbindetasche mit sich bringen könnte (Windshügel *et al.*, 2005).

Insgesamt wurden drei Positionen im xICARa mit signifikantem Einfluss sowie mindestens 2-fachen Veränderungen gegenüber dem Wildtyp nach Mutation zur homologen humanen Aminosäure auf die basale Aktivität identifiziert: Met272Val, Met316Phe sowie Thr305Val. Die Doppelmutante aus Met272Val und Met316Phe sowie die einfache Punktmutation von Thr305Val steigern die basale Aktivität des xICARa, sodass die basale Aktivität der xICARa Mutanten die des humanen Rezeptors übertreffen (Mathäs *et al.*, 2012).

Die Aminosäure Met272 liegt auf Helix 5 des xICARa. Sie ist Teil der Barriere, welche die Ligandenbindetasche des Rezeptors von der Aktivierungshelix 12 abschottet. Das Proteinmodell sowie die gesteigerte basale Aktivität in den Reporterassays ließen vermuten, dass durch die Humanisierung von Met272 zu Val (hsCAR: Val199) die Interaktion mit der Aktivierungshelix 12 verbessert wird und dadurch die Bindung an Koaktivatoren verstärkt wird. Da die Aminosäure Valin, die im Gegensatz zu dem verlängerten Rest von Methionin einen verzweigten Rest hat, könnten mehr Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen der Ligandenbindetasche und der Aktivierungshelix entstehen und diese so in die aktive Konformation bringen, wie sie für humanes CAR typisch ist (Mathäs *et al.*, 2012). Im *mammalian-two-hybrid*-Versuch konnte diese Hypothese bestätigt werden und die verbesserte basale Bindung an den Kofaktor PGC-1 α gezeigt werden.

Die Aminosäure Met316 liegt auf Helix 7 des xICARa. Durch die Humanisierung von Methionin zu Phenylalanin (hsCAR: Phe243) könnte nach Interpretation des Homologiemodells (Dr. B. Windshügel) die Orientierung der Helix 7 im Rezeptor stabilisiert werden und so die Flexibilität der anliegenden Helix 10/11 einschränken. Dies könnte die Interaktion der Helix 10/11 mit der Aktivierungshelix 12 verstärken, so eine aktive Konformation letzterer unterstützen und die Heterodimerisierung des xICARa mit RXRa verstärken. Diese Hypothese konnte in den *mammalian-two-hybrid*-Versuchen nicht bekräftigt werden. In den Versuchen konnte stattdessen eine gesteigerte Interaktion mit

dem Kofaktor PGC-1a gezeigt werden, welche für die gesteigerte basale Aktivität der xICARa Mutante verantwortlich scheint.

Die für Met272Val sowie Met316Phe angefertigte Doppelmutante zeigt im Reporterassay einen additiven Effekt der erhöhten basalen Aktivität. Dies trifft allerdings für die Proteininteraktionen, welche mit dem *mammalian-two-hybrid*-System untersucht wurden, nicht zu. Hier ist kein signifikanter Unterschied der Doppelmutante zu dem Wildtyprezeptor messbar. Möglicherweise resultiert die gesteigerte basale Aktivität der Doppelmutante aus einem anderen, nicht untersuchten Mechanismus, als die basale Aktivität der jeweils einzelnen Mutationen. Der molekulare Mechanismus der gesteigerten basalen Aktivität der Doppelmutante bleibt unklar.

Die dritte xICARa Mutante mit einer gesteigerten basalen Aktivität ist Thr305Val (hsCAR: Val232). Gemäß dem Homologiemodell von xICARa liegt Thr305 am C-terminalen Ende der Helix 6. Die polare Seitenkette von Threonin ist ins Innere des Proteins gerichtet. Die Humansisierung zu Valin zerstört wahrscheinlich die im Proteinmodell angezeigte Wasserstoffbrückenbindung zu Asp301 auf Helix 6. Die Aminosäuren, welche Thr305 direkt umgeben, sind entweder aromatisch oder aliphatisch: Leu231, Phe234, Phe297, Phe307, Ile406. Die unpolare Seitenkette der Valin-Mutante könnte verstärkt Van-der-Waals-Wechselwirkungen zu den benachbarten Aminosäuren auf Helices 3,6 sowie 10/11 ausbilden und somit die gesamte Proteinfaltung des Rezeptors und der Aktivierungshelix stabilisieren. Die *mammalian-two-hybrid*-Versuche zeigen, dass die gesteigerte basale Aktivität dieser Mutante auf eine verstärkte Bindung der Heterodimerisierungspartners RXRa sowie auf eine gesteigerte Rekrutierung des Kofaktors PGC-1a zurückzuführen ist.

Alle drei aktivierenden Mutanten zeigen eine verstärkte Interaktion mit dem Kofaktor PGC-1a. Diese Signalkaskade mit PGC-1a als Kofaktor könnte auf der Linie der Landvertebraten entstanden sein. PGC-1a spielt eine Rolle im Energiemetabolismus zum Beispiel bei der effizienten Energieaufnahme und Speicherung im Körper (Liu and Lin, 2011). Dies könnte bei der Fortbewegung an Land sowie bei Hungerperioden für Landvertebraten wichtig sein. Heute wird PGC-1a dementsprechend mit metabolischen Krankheiten wie Adipositas, Diabetes Typ 2, Neurodegeneration sowie Kardimyopathien in Zusammenhang gebracht (Liu and Lin, 2011; Miao *et al.*, 2006).

Einen signifikanten Einfluss auf die ligandenabhängige Aktivierung haben nur Mutanten mit einer signifikant veränderten basalen Aktivität. Eine erhöhte Basalaktivität geht in den getesteten Mutanten immer mit dem Verlust der Induzierbarkeit durch Liganden einher. Dies lässt den Schluss zu, dass die Aktivität des *Xenopus*-CAR ein Plateau erreicht. Bei erhöhter Basalaktivität ist die Aktivität des Rezeptors bereits so hoch, dass sie durch Ligandenbindung nur noch schwach gesteigert werden kann. Eine etwa 10-fach erhöhte Basalaktivität führt zum Beispiel zu einer etwa 10-fach verminderten Aktivierbarkeit durch

Pregnandion. Für Artemisinin sowie Fenofibrat sind die Änderungen im Vergleich zum Wildtyprezeptor etwas schwächer. Die beiden Mutanten mit signifikant verminderter Basalaktivität: Ile242Val sowie Lys296Leu zeigen ebenfalls eine verminderte Aktivierbarkeit durch Liganden. In diesem Fall ist eher ein Funktionsverlust des gesamten Rezeptors wahrscheinlich (*Loss-of-Function-Mutation*).

Die Daten zeigen außerdem, dass die Mutation einer Aminosäure der Ligandenbindetasche, welche mit einem gebundenen Liganden interagiert, die Induzierbarkeit des Rezeptors nicht beeinflussen. Die untersuchte Aminosäure His295 interagiert laut dem Homologiemodell von Dr. B. Windshügel mit den Liganden Fenofibrat sowie Pregnandion. Die Aminosäure Phe297 interagiert mit allen drei getesteten Liganden. Thr305 interagiert mit Fenofibrat, zeigt aber zusätzlich eine erhöhte basale Aktivität. Die Mutanten ohne erhöhte basale Aktivität zeigen keinen Einfluss auf die Induzierbarkeit des Rezeptors. Mutante Thr305Val zeigt eine reduzierte Induzierbarkeit durch alle drei Liganden, obwohl nur eine direkte Interaktion mit Fenofibrat besteht. Für diese Mutante ist also die erhöhte basale Aktivität ausschlaggebend für die Induzierbarkeit. Eine Einzelmutation scheint nicht ausreichend zu sein, um die Bindung eines Liganden und somit die Aktivierung des nukleären Rezeptors zu verhindern. Dies könnte auch an der Auswahl der Liganden liegen, welche eine hohe Affinität zu xCARa haben. C. Nußhag konnte im Verlauf seiner Doktorarbeit zeigen, dass eine Mutation von zwei den Liganden kontaktierenden Aminosäuren (His295Ala/Phe297Tyr) eine Reduktion der Aktivierbarkeit bei einer gleichbleibenden basalen Aktivität bewirken kann. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu Daten des humanen CAR, welcher nach Mutationen häufig seine Funktion völlig verliert (Jyrkkari *et al.*, 2005).

Im Gegensatz dazu stehen einige verstärkte Interaktionen der Mutanten mit dem Heterodimerisierungspartner RXR sowie den Kofaktoren SRC-1 und PGC-1a, welche weder die basale Aktivität noch die Induzierbarkeit des Rezeptors beeinflussen. Besonders auffällig ist die verstärkte Interaktion der Mutante Thr305Val mit dem Kofaktor SRC-1 nach Induktion mit Pregnandion ohne Kotransfektion von RXRa. Dieses Ergebnis konnte in einem *in vitro* Versuch, welcher die Bindung von SRC-1 zu dem humanisierten Rezeptor anzeigt (CARLA vgl. Abschnitt 3.2.6.5), reproduziert werden. Warum dies nicht in der Aktivierbarkeit durch Pregnandion im Reportergenversuch resultiert, bleibt unklar.

4.2.4 Positiv selektionierte Aminosäuren

Für den humanen CAR-Rezeptor wurden 5 Mutanten hergestellt. Insgesamt zeigen die Mutanten keine über 2-fachen Veränderungen in der basalen Aktivität oder Induzierbarkeit durch Liganden im Vergleich zu dem Wildtyprezeptor. Da diese positiv selektionierten Aminosäuren auf einer Analyse mit einer nach späteren Erkenntnissen falschen

Außengruppe beruhen, sind die Aminosäuren wahrscheinlich nicht relevant für die Funktion des Rezeptors.

Eine funktionelle Analyse der Aminosäuren, welche sich aus der erneuten Berechnung positiv selektionierter Aminosäuren mit VDR als Außengruppe ergibt, wäre interessant. Für eine Analyse der positiven Selektion würde sich außerdem die Mutation zum jeweils ancestralen Zustand statt einer Humanisierung besser eignen. Besonders interessant ist auf dem *Xenopus*-CAR-Ast die Aminosäure Ala275 mit dem höchsten P-Wert von 0,76. Diese Aminosäure wurde von C. Nußhag während seiner Doktorarbeit untersucht, zeigte jedoch im Reporter-gen-Versuch keine über 2-fache Veränderung gegenüber dem Wildtyprezeptor. Die vorangegangenen Versuche haben gezeigt, dass Einzelmutationen meistens keinen Effekt auf die basale Aktivität sowie Induzierbarkeit zeigen. Um die selektionierte Funktion des Rezeptors zu untersuchen, wäre es deshalb wahrscheinlich informativer, ein CAR-Expressionplasmid mit der ancestralen Sequenz des CAR-Rezeptors herzustellen. Dies könnte Aufschluss über die ursprüngliche Funktionsweise sowie die selektierten Eigenschaften der einzelnen Arten bieten.

4.2.5 Zielgene von xICARa

Unter den hepatischen Zielgenen des *Xenopus*-CAR befinden sich wie beim humanen Rezeptor ebenfalls Gene des Fremdstoffwechsels sowie des Energiestoffwechsels. Das Spektrum der einzelnen Gene unterscheidet sich von dem des humanen Rezeptors. Die dem humanen und *Xenopus*-CAR gemeinsamen Zielgene codieren für Produkte mit einer Rolle bei der Regulierung des Blutglukoselevels: Glukose-6-Phosphatase, AKR1C, welches endobiotische Ketone detoxifiziert (Tolson and Wang, 2010) sowie SLC16a, welches Lactat, Pyruvat, Ketone sowie Ketosäuren transportiert (Halestrap and Meredith, 2004). Die hohe basale Aktivität des CAR bei Landvertebraten könnte ihnen zu einer gesteigerten Glykolysekapazität sowie Keton-Verwertung verholfen haben. Dies könnte von Vorteil bei der Energiebereitstellung zur Fortbewegungsgeschwindigkeit sowie bei Hungerperioden geliefert haben. Dazu passt auch die gesteigerte Interaktion mit PGC-1 α bei Landvertebraten (Abschnitt 4.2.3).

In der Niere sind antimikrobielle Peptide nach Induktion mit CAR-Liganden eventuell stärker exprimiert. Aufgrund der kleinen Tierzahl und der starken Schwankungen zwischen den einzelnen Fröschen, konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied detektiert werden. Die Frösche waren unterschiedlicher Körpergröße und Alters, was die Variationen vermutlich verstärkte. CAR könnte ein transkriptioneller Regulator der antimikrobiellen Peptide sein. Die schrumpfenden Artbestände von Amphibien übertreffen die durch Habitatverlust erwarteten Zahlen (Pounds *et al.*, 2006) und wurden in Verbindung gebracht mit der infektiösen Krankheit Chytridiomykose, verursacht von dem pathogenen Hautpilz,

Batrachochytrium dendrobatidis (Berger *et al.*, 1998; Pounds *et al.*, 2006; Rachowicz *et al.*, 2006), sowie dem Iridovirus der Gattung *Ranavirus*. Antimikrobielle Peptide im Hautschleim der Amphibien fungieren als erste Barriere gegen diese Pathogene, was durch Korrelationsstudien zwischen der Effektivität der Peptide und den Populationsgrößen belegt wird. Unter den effektiven Peptiden befinden sich auch die differentiell exprimierten Peptide Magainin II und PGLa (Rollins-Smith, 2009). Die Expression dieser Gene wurde im Rahmen dieser Arbeit in der Niere und in der Blase nachgewiesen. Eine Abgabe von Peptiden aus der Niere und Blase könnte das Eindringen von Pathogenen durch die Kloake verhindern, außerdem ist vorstellbar, dass die Peptide mit dem Leich zusammen abgegeben werden und so den Leich ebenfalls vor dem Befall mit Pathogenen schützen. CAR könnte bei Amphibien so eine Rolle in der Aktivierung des angeborenen Immunsystems spielen.

4.3 Anpassung von Lebewesen an ihre Umwelt

In dieser Arbeit wurden transiente, dauerhafte sowie stabile Anpassungen von Lebewesen an ihren Lebensraum untersucht. Transiente Anpassung an sich schnell wandelnde Umweltbedingungen wie Fremdstoffe in der Nahrung sind energiesparend und ermöglichen eine Homöostase der endogenen Funktionen. Dauerhafte Anpassungen über mehrere Generationen könnten kleineren Populationen einen Überlebensvorteil durch adaptierte Genexpression geboten haben und so einen nicht unerheblichen Beitrag zur Evolution der Arten geleistet haben (Mirbahai and Chipman, 2013). Stabile Anpassungen durch Manifestationen von Polymorphismen in Populationen sind wesentlich langsamer. Die Anpassung an den Lebensraum entsteht durch natürliche Selektion.

Zu dieser Erkenntnis kam schon Charles Darwin (1809-1882). Doch bereits im Geburtsjahr von Charles Darwin veröffentlichte Jean Baptiste Lamarck ein umfassendes Modell zur Evolution des Lebens. Die Grundsätze Lamarcks Evolutionstheorie, dass erworbene Merkmale vererbt werden, wurden lange Zeit für falsch gehalten. Noch heute findet sich in Lehrbüchern die Aussage, dass es „keine Hinweise darauf [gibt], dass erworbene Merkmale vererbt werden können“ (Campbell and Reece, 2003). Handel und Ramagopalan (2010) schreiben, dass epigenetische Mechanismen heute eine „Koexistenz der Darwinischen und Lamarckschen Evolutionstheorie“ erlauben und fordern, dass die zukünftige Forschung sich darauf konzentrieren sollte, herauszufinden, welche Zustände sich auf epigenetische Veränderungen zurückführen lassen sowie nach medizinischen Eingriffsmöglichkeiten zu suchen, die zur Gesundheit beitragen (Handel and Ramagopalan, 2010).

Literaturverzeichnis

- Ainge, H., Thompson, C., Ozanne, S. E. and Rooney, K. B. (2011) A systematic review on animal models of maternal high fat feeding and offspring glycaemic control. *International journal of obesity*, 35, 325-335.
- Anway, M. D., Cupp, A. S., Uzumcu, M. and Skinner, M. K. (2005) Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* (New York, N.Y.), 308, 1466-1469.
- Arnold, K. A., Eichelbaum, M. and Burk, O. (2004) Alternative splicing affects the function and tissue-specific expression of the human constitutive androstane receptor. *Nuclear receptor*, 2, 1.
- Auerbach, S. S., Ramsden, R., Stoner, M. A., Verlinde, C., Hassett, C. and Omiecinski, C. J. (2003) Alternatively spliced isoforms of the human constitutive androstane receptor. *Nucleic acids research*, 31, 3194-3207.
- Beierle, I., Meibohm, B. and Derendorf, H. (1999) Gender differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 37, 529-547.
- Bellay, J., Han, S., Michaut, M., Kim, T., Costanzo, M., Andrews, B. J., Boone, C., Bader, G. D., Myers, C. L. and Kim, P. M. (2011) Bringing order to protein disorder through comparative genomics and genetic interactions. *Genome biology*, 12, R14.
- Benditt, E. P. and Eriksen, N. (1977) Amyloid protein SAA is associated with high density lipoprotein from human serum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 4025-4028.
- Benditt, E. P., Eriksen, N. and Hanson, R. H. (1979) Amyloid protein SAA is an apoprotein of mouse plasma high density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 4092-4096.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. L., Slocombe, R., Ragan, M. A., Hyatt, A. D., McDonald, K. R., Hines, H. B., Lips, K. R., Marantelli, G. and Parkes, H. (1998) Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 9031-9036.
- Bertilsson, G., Heidrich, J., Svensson, K., Asman, M., Jendeberg, L., Sydow-Backman, M., Ohlsson, R., Postlind, H., Blomquist, P. and Berkenstam, A. (1998) Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 12208-12213.
- Blizard, D., Sueyoshi, T., Negishi, M., Dehal, S. S. and Kupfer, D. (2001) Mechanism of induction of cytochrome p450 enzymes by the proestrogenic endocrine disruptor pesticide-methoxychlor: interactions of methoxychlor metabolites with the constitutive androstane receptor system. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 29, 781-785.
- Blumberg, B., Kang, H., Bolado, J., Jr., Chen, H., Craig, A. G., Moreno, T. A., Umesono, K., Perlmann, T., De Robertis, E. M. and Evans, R. M. (1998) BXR, an embryonic orphan nuclear receptor activated by a novel class of endogenous benzoate metabolites. *Genes & development*, 12, 1269-1277.
- Bros, M., Ross, X. L., Pautz, A., Reske-Kunz, A. B. and Ross, R. (2003) The human fascin gene promoter is highly active in mature dendritic cells due to a stage-specific enhancer. *J Immunol*, 171, 1825-1834.
- Buajordet, I., Ebbesen, J., Erikssen, J., Brors, O. and Hilberg, T. (2001) Fatal adverse drug events: the paradox of drug treatment. *Journal of internal medicine*, 250, 327-341.
- Buchner, J. (2005) Protein folding handbook. (Ed. Buchner, J.) Wiley-VCH, Weinheim, pp. 62-71.
- Burk, O., Piedade, R., Ghebregiorghis, L., Fait, J. T., Nussler, A. K., Gil, J. P., Windshugel, B. and Schwab, M. (2012) Differential effects of clinically used

- derivatives and metabolites of artemisinin in the activation of constitutive androstane receptor isoforms. *British journal of pharmacology*, 167, 666-681.
- Cai, Y., Konishi, T., Han, G., Campwala, K. H., French, S. W. and Wan, Y. J. (2002) The role of hepatocyte RXR alpha in xenobiotic-sensing nuclear receptor-mediated pathways. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 15, 89-96.
- Campbell, N. A. and Reece, J. B. (2003) *Biologie*, Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg [u.a.].
- Cascorbi, I. (2012) Drug interactions--principles, examples and clinical consequences. *Deutsches Arzteblatt international*, 109, 546-555; quiz 556.
- Castillo, M., Hall, J. A., Correa-Medina, M., Ueta, C., Kang, H. W., Cohen, D. E. and Bianco, A. C. (2011) Disruption of thyroid hormone activation in type 2 deiodinase knockout mice causes obesity with glucose intolerance and liver steatosis only at thermoneutrality. *Diabetes*, 60, 1082-1089.
- Chai, X., Zeng, S. and Xie, W. (2013) Nuclear receptors PXR and CAR: implications for drug metabolism regulation, pharmacogenomics and beyond. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 9, 253-266.
- Chen, T., Tompkins, L. M., Li, L., Li, H., Kim, G., Zheng, Y. and Wang, H. (2010) A single amino acid controls the functional switch of human constitutive androstane receptor (CAR) 1 to the xenobiotic-sensitive splicing variant CAR3. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 332, 106-115.
- Chen, W. D., Fu, X., Dong, B., Wang, Y. D., Shiah, S., Moore, D. D. and Huang, W. (2012) Neonatal activation of the nuclear receptor CAR results in epigenetic memory and permanent change of drug metabolism in mouse liver. *Hepatology*.
- Cheng, X., Maher, J., Dieter, M. Z. and Klaassen, C. D. (2005) Regulation of mouse organic anion-transporting polypeptides (Oatps) in liver by prototypical microsomal enzyme inducers that activate distinct transcription factor pathways. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 33, 1276-1282.
- Choi, E., Lee, S., Yeom, S. Y., Kim, G. H., Lee, J. W. and Kim, S. W. (2005) Characterization of activating signal cointegrator-2 as a novel transcriptional coactivator of the xenobiotic nuclear receptor constitutive androstane receptor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*, 19, 1711-1719.
- Chrencik, J. E., Orans, J., Moore, L. B., Xue, Y., Peng, L., Collins, J. L., Wisely, G. B., Lambert, M. H., Kliewer, S. A. and Redinbo, M. R. (2005) Structural disorder in the complex of human pregnane X receptor and the macrolide antibiotic rifampicin. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*, 19, 1125-1134.
- Christensen, B. C., Houseman, E. A., Marsit, C. J., Zheng, S., Wrensch, M. R., Wiemels, J. L., Nelson, H. H., Karagas, M. R., Padbury, J. F., Bueno, R., Sugarbaker, D. J., Yeh, R. F., Wiencke, J. K. and Kelsey, K. T. (2009) Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS genetics*, 5, e1000602.
- Coumoul, X., Diry, M. and Barouki, R. (2002) PXR-dependent induction of human CYP3A4 gene expression by organochlorine pesticides. *Biochemical pharmacology*, 64, 1513-1519.
- Dass, B., Tardif, S., Park, J. Y., Tian, B., Weitlauf, H. M., Hess, R. A., Carnes, K., Griswold, M. D., Small, C. L. and Macdonald, C. C. (2007) Loss of polyadenylation protein tauCstF-64 causes spermatogenic defects and male infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 20374-20379.
- DeKeyser, J. G., Laurenzana, E. M., Peterson, E. C., Chen, T. and Omiecinski, C. J. (2011) Selective phthalate activation of naturally occurring human constitutive androstane receptor splice variants and the pregnane X receptor. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 120, 381-391.
- DeKeyser, J. G., Stagliano, M. C., Auerbach, S. S., Prabhu, K. S., Jones, A. D. and Omiecinski, C. J. (2009) Di(2-ethylhexyl) phthalate is a highly potent agonist for the human constitutive androstane receptor splice variant CAR2. *Molecular pharmacology*, 75, 1005-1013.

- di Masi, A., De Marinis, E., Ascenzi, P. and Marino, M. (2009) Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. *Mol Aspects Med*, 30, 297-343.
- Ding, X. and Staudinger, J. L. (2005) Induction of drug metabolism by forskolin: the role of the pregnane X receptor and the protein kinase a signal transduction pathway. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 312, 849-856.
- Dong, B., Saha, P. K., Huang, W., Chen, W., Abu-Elheiga, L. A., Wakil, S. J., Stevens, R. D., Ilkayeva, O., Newgard, C. B., Chan, L. and Moore, D. D. (2009) Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 18831-18836.
- Drake, A. J., Tang, J. I. and Nyirenda, M. J. (2007) Mechanisms underlying the role of glucocorticoids in the early life programming of adult disease. *Clinical science*, 113, 219-232.
- Ernst, E. (1999) Second thoughts about safety of St John's wort. *Lancet*, 354, 2014-2016.
- Evans, W. E. and Relling, M. V. (1999) Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, 286, 487-491.
- Ezoe, S. (2012) Secondary leukemia associated with the anti-cancer agent, etoposide, a topoisomerase II inhibitor. *International journal of environmental research and public health*, 9, 2444-2453.
- Faucette, S. R., Zhang, T. C., Moore, R., Sueyoshi, T., Omiecinski, C. J., LeCluyse, E. L., Negishi, M. and Wang, H. (2007) Relative activation of human pregnane X receptor versus constitutive androstane receptor defines distinct classes of CYP2B6 and CYP3A4 inducers. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 320, 72-80.
- Flexner, C. (2000) Dual protease inhibitor therapy in HIV-infected patients: pharmacologic rationale and clinical benefits. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 40, 649-674.
- Forman, B. M., Tzamelis, I., Choi, H. S., Chen, J., Simha, D., Seol, W., Evans, R. M. and Moore, D. D. (1998) Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature*, 395, 612-615.
- Gao, J., He, J., Zhai, Y., Wada, T. and Xie, W. (2009) The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity. *The Journal of biological chemistry*, 284, 25984-25992.
- Giller, K., Huebbe, P., Doering, F., Pallauf, K. and Rimbach, G. (2013) Major urinary protein 5, a scent communication protein, is regulated by dietary restriction and subsequent re-feeding in mice. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 280, 20130101.
- Gluzman, Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, 23, 175-182.
- Gnerre, C., Schuster, G. U., Roth, A., Handschin, C., Johansson, L., Looser, R., Parini, P., Podvynec, M., Robertsson, K., Gustafsson, J. A. and Meyer, U. A. (2005) LXR deficiency and cholesterol feeding affect the expression and phenobarbital-mediated induction of cytochromes P450 in mouse liver. *Journal of lipid research*, 46, 1633-1642.
- Godtel-Armbrust, U., Metzger, A., Kroll, U., Kelber, O. and Wojnowski, L. (2007) Variability in PXR-mediated induction of CYP3A4 by commercial preparations and dry extracts of St. John's wort. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 375, 377-382.
- Goodwin, B., Hodgson, E. and Liddle, C. (1999) The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. *Molecular pharmacology*, 56, 1329-1339.
- Grieco, A., Forgione, A., Miele, L., Vero, V., Greco, A. V., Gasbarrini, A. and Gasbarrini, G. (2005) Fatty liver and drugs. *European review for medical and pharmacological sciences*, 9, 261-263.
- Grün, F., Venkatesan, R. N., Tabb, M. M., Zhou, C., Cao, J., Hemmati, D. and Blumberg, B. (2002) Benzoate X receptors alpha and beta are pharmacologically distinct and do not function as xenobiotic receptors. *The Journal of biological chemistry*, 277, 43691-43697.

- Guerrero-Bosagna, C. and Skinner, M. K. (2012) Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of phenotype and disease. *Molecular and cellular endocrinology*, 354, 3-8.
- Halestrap, A. P. and Meredith, D. (2004) The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 447, 619-628.
- Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. *Nucl Acids Symp Ser*, 41, 95-98.
- Handel, A. E. and Ramagopalan, S. V. (2010) Is Lamarckian evolution relevant to medicine? *BMC medical genetics*, 11, 73.
- Handschin, C., Blattler, S., Roth, A., Looser, R., Oscarson, M., Kaufmann, M. R., Podvinec, M., Gnerre, C. and Meyer, U. A. (2004) The evolution of drug-activated nuclear receptors: one ancestral gene diverged into two xenosensor genes in mammals. *Nuclear receptor*, 2, 7.
- Handschin, C. and Meyer, U. A. (2003) Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacological reviews*, 55, 649-673.
- Handschin, C., Podvinec, M. and Meyer, U. A. (2000) CXR, a chicken xenobiotic-sensing orphan nuclear receptor, is related to both mammalian pregnane X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 10769-10774.
- Heath, L. A., Jones, E. A. and Old, R. W. (2000) Expression pattern of BXR suggests a role for benzoate ligand-mediated signalling in hatching gland function. *The International journal of developmental biology*, 44, 141-144.
- Henderson, L., Yue, Q. Y., Bergquist, C., Gerden, B. and Arlett, P. (2002) St John's wort (*Hypericum perforatum*): drug interactions and clinical outcomes. *British journal of clinical pharmacology*, 54, 349-356.
- Ho, D. H. and Burggren, W. W. (2010) Epigenetics and transgenerational transfer: a physiological perspective. *The Journal of experimental biology*, 213, 3-16.
- Holick, M. F. (2005) Stay tuned to PXR: an orphan actor that may not be D-structive only to bone. *The Journal of clinical investigation*, 115, 32-34.
- Hosseinpour, F., Moore, R., Negishi, M. and Sueyoshi, T. (2006) Serine 202 regulates the nuclear translocation of constitutive active/androstane receptor. *Molecular pharmacology*, 69, 1095-1102.
- Huang, W., Zhang, J., Chua, S. S., Qatanani, M., Han, Y., Granata, R. and Moore, D. D. (2003) Induction of bilirubin clearance by the constitutive androstane receptor (CAR). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 4156-4161.
- Inoue, K., Borchers, C. H. and Negishi, M. (2006) Cohesin protein SMC1 represses the nuclear receptor CAR-mediated synergistic activation of a human P450 gene by xenobiotics. *The Biochemical journal*, 398, 125-133.
- Iyer, M., Reschly, E. J. and Krasowski, M. D. (2006) Functional evolution of the pregnane X receptor. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 2, 381-397.
- Jarukamjorn, K., Sakuma, T., Jaruchotikamol, A., Ishino, Y., Oguro, M. and Nemoto, N. (2006) Modified expression of cytochrome P450 mRNAs by growth hormone in mouse liver. *Toxicology*, 219, 97-105.
- Jarukamjorn, K., Sakuma, T., Miyaura, J. and Nemoto, N. (1999) Different regulation of the expression of mouse hepatic cytochrome P450 2B enzymes by glucocorticoid and phenobarbital. *Archives of biochemistry and biophysics*, 369, 89-99.
- Jin, L. and Li, Y. (2010) Structural and functional insights into nuclear receptor signaling. *Advanced drug delivery reviews*, 62, 1218-1226.
- Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Hanioka, N., Ishida, S., Saeki, M., Soyama, A., Itoda, M., Nishimura, T., Saito, Y., Ozawa, S., Ando, M. and Sawada, J. (2004) Identification of novel alternative splice variants of human constitutive androstane receptor and characterization of their expression in the liver. *Molecular pharmacology*, 65, 496-502.
- Jyrkkarine, J., Windshugel, B., Makinen, J., Ylisirnio, M., Perakyla, M., Poso, A., Sippl, W. and Honkakoski, P. (2005) Amino acids important for ligand specificity of the human constitutive androstane receptor. *The Journal of biological chemistry*, 280, 5960-5971.

- Kanno, Y. and Inouye, Y. (2010) A consecutive three alanine residue insertion mutant of human CAR: a novel CAR ligand screening system in HepG2 cells. *The Journal of toxicological sciences*, 35, 515-525.
- Kawamoto, T., Sueyoshi, T., Zelko, I., Moore, R., Washburn, K. and Negishi, M. (1999) Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene. *Molecular and cellular biology*, 19, 6318-6322.
- King-Jones, K. and Thummel, C. S. (2005) Nuclear receptors--a perspective from *Drosophila*. *Nature reviews. Genetics*, 6, 311-323.
- King, V., Dakin, R. S., Liu, L., Hadoke, P. W., Walker, B. R., Seckl, J. R., Norman, J. E. and Drake, A. J. (2013) Maternal obesity has little effect on the immediate offspring but impacts on the next generation. *Endocrinology*, 154, 2514-2524.
- Kobayashi, K., Sueyoshi, T., Inoue, K., Moore, R. and Negishi, M. (2003) Cytoplasmic accumulation of the nuclear receptor CAR by a tetratricopeptide repeat protein in HepG2 cells. *Molecular pharmacology*, 64, 1069-1075.
- Köhle, C. and Bock, K. W. (2009) Coordinate regulation of human drug-metabolizing enzymes, and conjugate transporters by the Ah receptor, pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Biochemical pharmacology*, 77, 689-699.
- Köhle, C., Schwarz, M. and Bock, K. W. (2008) Promotion of hepatocarcinogenesis in humans and animal models. *Archives of toxicology*, 82, 623-631.
- Krasowski, M. D., Ai, N., Hagey, L. R., Kollitz, E. M., Kullman, S. W., Reschly, E. J. and Ekins, S. (2011a) The evolution of farnesoid X, vitamin D, and pregnane X receptors: insights from the green-spotted pufferfish (*Tetraodon nigriviridis*) and other non-mammalian species. *BMC biochemistry*, 12, 5.
- Krasowski, M. D., Ni, A., Hagey, L. R. and Ekins, S. (2011b) Evolution of promiscuous nuclear hormone receptors: LXR, FXR, VDR, PXR, and CAR. *Molecular and cellular endocrinology*, 334, 39-48.
- Krasowski, M. D., Reschly, E. J. and Ekins, S. (2008) Intrinsic disorder in nuclear hormone receptors. *Journal of proteome research*, 7, 4359-4372.
- Kublbeck, J., Laitinen, T., Jyrkkari, J., Rousu, T., Tolonen, A., Abel, T., Kortelainen, T., Uusitalo, J., Korjamo, T., Honkakoski, P. and Molnar, F. (2011) Use of comprehensive screening methods to detect selective human CAR activators. *Biochemical pharmacology*, 82, 1994-2007.
- Kuzbari, O., Peterson, C. M., Franklin, M. R., Hathaway, L. B., Johnstone, E. B., Hammoud, A. O. and Lamb, J. G. (2013) Comparative analysis of human CYP3A4 and rat CYP3A1 induction and relevant gene expression by bisphenol A and diethylstilbestrol: implications for toxicity testing paradigms. *Reproductive toxicology*, 37, 24-30.
- Lahtela, J. T., Arranto, A. J. and Sotaniemi, E. A. (1985) Enzyme inducers improve insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetic subjects. *Diabetes*, 34, 911-916.
- Langmann, T., Moehle, C., Mauerer, R., Scharl, M., Liebisch, G., Zahn, A., Stremmel, W. and Schmitz, G. (2004) Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes. *Gastroenterology*, 127, 26-40.
- Lavrovsky, Y., Song, C. S., Chatterjee, B. and Roy, A. K. (1998) A rapid and reliable PCR-based assay for gene transmission and sex determination in newborn transgenic mice. *Transgenic research*, 7, 319-320.
- Ledda-Columbano, G. M., Pibiri, M., Concas, D., Molotzu, F., Simbula, G., Cossu, C. and Columbano, A. (2003) Sex difference in the proliferative response of mouse hepatocytes to treatment with the CAR ligand, TCPOBOP. *Carcinogenesis*, 24, 1059-1065.
- Lehmann, J. M., McKee, D. D., Watson, M. A., Willson, T. M., Moore, J. T. and Kliewer, S. A. (1998) The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *The Journal of clinical investigation*, 102, 1016-1023.
- Lempiäinen, H., Muller, A., Brasa, S., Teo, S. S., Roloff, T. C., Morawiec, L., Zamurovic, N., Vicart, A., Funhoff, E., Couttet, P., Schubeler, D., Grenet, O., Marlowe, J., Moggs, J. and Terranova, R. (2011) Phenobarbital mediates an epigenetic switch at the constitutive androstane receptor (CAR) target gene *Cyp2b10* in the liver of B6C3F1 mice. *PLoS one*, 6, e18216.

- Liu, C. and Lin, J. D. (2011) PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 43, 248-257.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-408.
- Löscher, W., Nau, H., Wahnschaffe, U., Honack, D., Rundfeldt, C., Wittfoht, W. and Bojic, U. (1993) Effects of valproate and E-2-en-valproate on functional and morphological parameters of rat liver. II. Influence of phenobarbital comedication. *Epilepsy research*, 15, 113-131.
- Lucado, J., Paez, K. and Elixhauser, A. (2011) Medication-Related Adverse Outcomes in U.S. Hospitals and Emergency Departments, 2008: Statistical Brief #109. In *Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs* Rockville (MD).
- Ma, X., Idle, J. R. and Gonzalez, F. J. (2008) The pregnane X receptor: from bench to bedside. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 4, 895-908.
- Ma, Y. and Liu, D. (2012) Activation of pregnane X receptor by pregnenolone 16 alpha-carbonitrile prevents high-fat diet-induced obesity in AKR/J mice. *PloS one*, 7, e38734.
- Maglich, J. M., Parks, D. J., Moore, L. B., Collins, J. L., Goodwin, B., Billin, A. N., Stoltz, C. A., Kliewer, S. A., Lambert, M. H., Willson, T. M. and Moore, J. T. (2003) Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes. *The Journal of biological chemistry*, 278, 17277-17283.
- Marino, M., di Masi, A., Trezza, V., Pallottini, V., Polticelli, F. and Ascenzi, P. (2011) Xenosensors CAR and PXR at work: impact on statin metabolism. *Current drug metabolism*, 12, 300-311.
- Marsili, A., Aguayo-Mazzucato, C., Chen, T., Kumar, A., Chung, M., Lunsford, E. P., Harney, J. W., Van-Tran, T., Gianetti, E., Ramadan, W., Chou, C., Bonner-Weir, S., Larsen, P. R., Silva, J. E. and Zavacki, A. M. (2011) Mice with a targeted deletion of the type 2 deiodinase are insulin resistant and susceptible to diet induced obesity. *PloS one*, 6, e20832.
- Martinez, A., Marquez, A., Mendoza, J., Taxonera, C., Fernandez-Arquero, M., Diaz-Rubio, M., de la Concha, E. G. and Urcelay, E. (2007) Role of the PXR gene locus in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*, 13, 1484-1487.
- Masuyama, H. and Hiramatsu, Y. (2012a) Treatment with a constitutive androstane receptor ligand ameliorates the signs of preeclampsia in high-fat diet-induced obese pregnant mice. *Molecular and cellular endocrinology*, 348, 120-127.
- Masuyama, H. and Hiramatsu, Y. (2012b) Treatment with Constitutive Androstane Receptor Ligand during Pregnancy Prevents Insulin Resistance in Offspring from High- fat Diet-Induced Obese Pregnant Mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*.
- Mathäs, M., Burk, O., Qiu, H., Nussbag, C., Godtel-Armbrust, U., Baranyai, D., Deng, S., Romer, K., Nem, D., Windshugel, B. and Wojnowski, L. (2012) Evolutionary History and Functional Characterization of the Amphibian Xenosensor CAR. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*, 26, 14-26.
- Miao, J., Fang, S., Bae, Y. and Kemper, J. K. (2006) Functional inhibitory cross-talk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1alpha. *The Journal of biological chemistry*, 281, 14537-14546.
- Min, G., Kemper, J. K. and Kemper, B. (2002) Glucocorticoid receptor-interacting protein 1 mediates ligand-independent nuclear translocation and activation of constitutive androstane receptor in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 277, 26356-26363.
- Mirbahai, L. and Chipman, J. K. (2013) Epigenetic memory of environmental organisms: A reflection of lifetime stressor exposures. *Mutation research*.
- Molnár, F., Kublbeck, J., Jyrkkarinne, J., Prantner, V. and Honkakoski, P. (2013) An update on the constitutive androstane receptor (CAR). *Drug metabolism and drug interactions*, 28, 79-93.

- Moore, L. B., Parks, D. J., Jones, S. A., Bledsoe, R. K., Consler, T. G., Stimmel, J. B., Goodwin, B., Liddle, C., Blanchard, S. G., Willson, T. M., Collins, J. L. and Kliewer, S. A. (2000) Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *The Journal of biological chemistry*, 275, 15122-15127.
- Moorthy, B., Sriram, P., Randerath, E. and Randerath, K. (1997) Effects of cytochrome P450 inducers on tamoxifen genotoxicity in female mice in vivo. *Biochemical pharmacology*, 53, 663-669.
- Moreau, A., Vilarem, M. J., Maurel, P. and Pascussi, J. M. (2008) Xenoreceptors CAR and PXR activation and consequences on lipid metabolism, glucose homeostasis, and inflammatory response. *Molecular pharmaceutics*, 5, 35-41.
- Morere, P., Nouvet, G., Stain, J. P., Paillot, B., Metayer, J. and Hemet, J. (1975) [Information obtained by liver biopsy in 100 tuberculous patients]. *La semaine des hopitaux : organe fonde par l'Association d'enseignement medical des hopitaux de Paris*, 51, 2095-2102.
- Moriya, N., Kataoka, H., Fujino, H., Nishikawa, J. and Kugawa, F. (2012) Effect of lipopolysaccharide on the xenobiotic-induced expression and activity of hepatic cytochrome P450 in mice. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 35, 473-480.
- Muangmoonchai, R., Smirlis, D., Wong, S. C., Edwards, M., Phillips, I. R. and Shephard, E. A. (2001) Xenobiotic induction of cytochrome P450 2B1 (CYP2B1) is mediated by the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (CAR) and requires steroid co-activator 1 (SRC-1) and the transcription factor Sp1. *The Biochemical journal*, 355, 71-78.
- Mugundu, G. M., Hariparsad, N. and Desai, P. B. (2010) Impact of ritonavir, atazanavir and their combination on the CYP3A4 induction potential of efavirenz in primary human hepatocytes. *Drug metabolism letters*, 4, 45-50.
- Nem, D., Baranyai, D., Qiu, H., Godtel-Armbrust, U., Nestler, S. and Wojnowski, L. (2012) Pregnane X receptor and yin yang 1 contribute to the differential tissue expression and induction of CYP3A5 and CYP3A4. *PloS one*, 7, e30895.
- Orans, J., Teotico, D. G. and Redinbo, M. R. (2005) The nuclear xenobiotic receptor pregnane X receptor: recent insights and new challenges. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*, 19, 2891-2900.
- Oscarson, M., Zanger, U. M., Rifki, O. F., Klein, K., Eichelbaum, M. and Meyer, U. A. (2006) Transcriptional profiling of genes induced in the livers of patients treated with carbamazepine. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 80, 440-456.
- Painter, R. C., Osmond, C., Gluckman, P., Hanson, M., Phillips, D. I. and Roseboom, T. J. (2008) Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, 115, 1243-1249.
- Persson, K. P., Ekehed, S., Otter, C., Lutz, E. S., McPheat, J., Masimirembwa, C. M. and Andersson, T. B. (2006) Evaluation of human liver slices and reporter gene assays as systems for predicting the cytochrome p450 induction potential of drugs in vivo in humans. *Pharmaceutical research*, 23, 56-69.
- Poland, A., Mak, I., Glover, E., Boatman, R. J., Ebetino, F. H. and Kende, A. S. (1980) 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene, a potent phenobarbital-like inducer of microsomal monooxygenase activity. *Molecular pharmacology*, 18, 571-580.
- Pounds, J. A., Bustamante, M. R., Coloma, L. A., Consuegra, J. A., Fogden, M. P., Foster, P. N., La Marca, E., Masters, K. L., Merino-Viteri, A., Puschendorf, R., Ron, S. R., Sanchez-Azofeifa, G. A., Still, C. J. and Young, B. E. (2006) Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439, 161-167.
- Rachowicz, L. J., Knapp, R. A., Morgan, J. A., Stice, M. J., Vredenburg, V. T., Parker, J. M. and Briggs, C. J. (2006) Emerging infectious disease as a proximate cause of amphibian mass mortality. *Ecology*, 87, 1671-1683.
- Ray, W. A., Murray, K. T., Meredith, S., Narasimhulu, S. S., Hall, K. and Stein, C. M. (2004) Oral erythromycin and the risk of sudden death from cardiac causes. *The New England journal of medicine*, 351, 1089-1096.
- Robert, E. (1983) Valproic acid in pregnancy--association with spina bifida: a preliminary report. *Clinical pediatrics*, 22, 336.

- Rochel, N., Wurtz, J. M., Mitschler, A., Klaholz, B. and Moras, D. (2000) The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Molecular cell*, 5, 173-179.
- Rollins-Smith, L. A. (2009) The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. *Biochimica et biophysica acta*, 1788, 1593-1599.
- Ruschitzka, F., Meier, P. J., Turina, M., Luscher, T. F. and Noll, G. (2000) Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *Lancet*, 355, 548-549.
- Salian, S., Doshi, T. and Vanage, G. (2009) Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the fertility of male offspring. *Life sciences*, 85, 742-752.
- Savkur, R. S., Wu, Y., Bramlett, K. S., Wang, M., Yao, S., Perkins, D., Totten, M., Searfoss, G., 3rd, Ryan, T. P., Su, E. W. and Burris, T. P. (2003) Alternative splicing within the ligand binding domain of the human constitutive androstane receptor. *Molecular genetics and metabolism*, 80, 216-226.
- Sawyer, D. B. (2013) Anthracyclines and heart failure. *The New England journal of medicine*, 368, 1154-1156.
- Scheer, N., Ross, J., Rode, A., Zevnik, B., Niehaves, S., Faust, N. and Wolf, C. R. (2008) A novel panel of mouse models to evaluate the role of human pregnane X receptor and constitutive androstane receptor in drug response. *The Journal of clinical investigation*, 118, 3228-3239.
- Schurter, B. T., Koh, S. S., Chen, D., Bunick, G. J., Harp, J. M., Hanson, B. L., Henschel-Edman, A., Mackay, D. R., Stallcup, M. R. and Aswad, D. W. (2001) Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Biochemistry*, 40, 5747-5756.
- Shah, S. C., Sharma, R. K., Hemangini and Chitle, A. R. (1981) Rifampicin induced osteomalacia. *Tubercle*, 62, 207-209.
- Shan, L., Vincent, J., Brunzelle, J. S., Dussault, I., Lin, M., Ianculescu, I., Sherman, M. A., Forman, B. M. and Fernandez, E. J. (2004) Structure of the murine constitutive androstane receptor complexed to androstenol: a molecular basis for inverse agonism. *Molecular cell*, 16, 907-917.
- Skinner, M. K. (2008) What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2. *Reproductive toxicology*, 25, 2-6.
- Skinner, M. K., Manikkam, M. and Guerrero-Bosagna, C. (2010) Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 21, 214-222.
- Smith, G., Henderson, C. J., Parker, M. G., White, R., Bars, R. G. and Wolf, C. R. (1993) 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene, an extremely potent modulator of mouse hepatic cytochrome P-450 gene expression. *The Biochemical journal*, 289 (Pt 3), 807-813.
- Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., Allis, C. D., Zhou, J., Mizzen, C. A., McKenna, N. J., Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (1997) Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, 389, 194-198.
- Squires, E. J., Sueyoshi, T. and Negishi, M. (2004) Cytoplasmic localization of pregnane X receptor and ligand-dependent nuclear translocation in mouse liver. *The Journal of biological chemistry*, 279, 49307-49314.
- Tabassum, R., Jaiswal, A., Chauhan, G., Dwivedi, O. P., Ghosh, S., Marwaha, R. K., Tandon, N. and Bharadwaj, D. (2012) Genetic variant of AMD1 is associated with obesity in urban Indian children. *PloS one*, 7, e33162.
- Timsit, Y. E. and Negishi, M. (2007) CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. *Steroids*, 72, 231-246.
- Tojima, H., Kakizaki, S., Yamazaki, Y., Takizawa, D., Horiguchi, N., Sato, K. and Mori, M. (2012) Ligand dependent hepatic gene expression profiles of nuclear receptors CAR and PXR. *Toxicology letters*, 212, 288-297.
- Tolson, A. H. and Wang, H. (2010) Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Advanced drug delivery reviews*, 62, 1238-1249.
- Tom, B. H., Rutzky, L. P., Jakstys, M. M., Oyasu, R., Kaye, C. I. and Kahan, B. D. (1976) Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line. *In vitro*, 12, 180-191.

- van Dalen, E. C., Caron, H. N., Dickinson, H. O. and Kremer, L. C. (2011) Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. The Cochrane database of systematic reviews, CD003917.
- Veenendaal, M. V., Painter, R. C., de Rooij, S. R., Bossuyt, P. M., van der Post, J. A., Gluckman, P. D., Hanson, M. A. and Roseboom, T. J. (2013) Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45 Dutch famine. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, 120, 548-553.
- Venkatesan, N., Davidson, M. B., Simsolo, R. B. and Kern, P. A. (1994) Phenobarbital treatment enhances insulin-mediated glucose metabolism and improves lipid metabolism in the diabetic rat. *Metabolism: clinical and experimental*, 43, 348-356.
- Wada, T., Gao, J. and Xie, W. (2009) PXR and CAR in energy metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 20, 273-279.
- Wang, H., Faucette, S., Moore, R., Sueyoshi, T., Negishi, M. and LeCluyse, E. (2004) Human constitutive androstane receptor mediates induction of CYP2B6 gene expression by phenytoin. *The Journal of biological chemistry*, 279, 29295-29301.
- Wang, Z., Lin, Y. S., Zheng, X. E., Senn, T., Hashizume, T., Scian, M., Dickmann, L. J., Nelson, S. D., Baillie, T. A., Hebert, M. F., Blough, D., Davis, C. L. and Thummel, K. E. (2012) An inducible cytochrome P450 3A4-dependent vitamin D catabolic pathway. *Molecular pharmacology*, 81, 498-509.
- Watkins, R. E., Wisely, G. B., Moore, L. B., Collins, J. L., Lambert, M. H., Williams, S. P., Willson, T. M., Kliewer, S. A. and Redinbo, M. R. (2001) The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity. *Science (New York, N.Y.)*, 292, 2329-2333.
- Windshügel, B. and Poso, A. (2011) Constitutive activity and ligand-dependent activation of the nuclear receptor CAR-insights from molecular dynamics simulations. *Journal of molecular recognition : JMR*, 24, 875-882.
- Windshugel, B., Jyrkkarinne, J., Poso, A., Honkakoski, P. and Sippl, W. (2005) Molecular dynamics simulations of the human CAR ligand-binding domain: deciphering the molecular basis for constitutive activity. *Journal of molecular modeling*, 11, 69-79.
- Wu, B., Li, S. and Dong, D. (2013) 3D structures and ligand specificities of nuclear xenobiotic receptors CAR, PXR and VDR. *Drug discovery today*.
- Xie, W., Barwick, J. L., Downes, M., Blumberg, B., Simon, C. M., Nelson, M. C., Neuschwander-Tetri, B. A., Brunt, E. M., Guzelian, P. S. and Evans, R. M. (2000) Humanized xenobiotic response in mice expressing nuclear receptor SXR. *Nature*, 406, 435-439.
- Xie, W., Radominska-Pandya, A., Shi, Y., Simon, C. M., Nelson, M. C., Ong, E. S., Waxman, D. J. and Evans, R. M. (2001) An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 3375-3380.
- Xu, C., Wang, X. and Staudinger, J. L. (2009) Regulation of tissue-specific carboxylesterase expression by pregnane x receptor and constitutive androstane receptor. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 37, 1539-1547.
- Xu, R. X., Lambert, M. H., Wisely, B. B., Warren, E. N., Weinert, E. E., Waitt, G. M., Williams, J. D., Collins, J. L., Moore, L. B., Willson, T. M. and Moore, J. T. (2004) A structural basis for constitutive activity in the human CAR/RXRalpha heterodimer. *Molecular cell*, 16, 919-928.
- Yang, H., Garzel, B., Heyward, S., Moeller, T., Shapiro, P. and Wang, H. (2013) Metformin Represses Drug-induced Expression of CYP2B6 by Modulating the Constitutive Androstane Receptor Signaling. *Molecular pharmacology*.
- Yoshinari, K., Kobayashi, K., Moore, R., Kawamoto, T. and Negishi, M. (2003) Identification of the nuclear receptor CAR:HSP90 complex in mouse liver and recruitment of protein phosphatase 2A in response to phenobarbital. *FEBS letters*, 548, 17-20.
- Zee, Y. K., Goh, B. C. and Lee, S. C. (2012) Pharmacologic modulation strategies to reduce dose requirements of anticancer therapy while preserving clinical efficacy. *Future oncology*, 8, 731-749.

- Zelko, I., Sueyoshi, T., Kawamoto, T., Moore, R. and Negishi, M. (2001) The peptide near the C terminus regulates receptor CAR nuclear translocation induced by xenochemicals in mouse liver. *Molecular and cellular biology*, 21, 2838-2846.
- Zhou, C., Tabb, M. M., Nelson, E. L., Grun, F., Verma, S., Sadatrafiei, A., Lin, M., Mallick, S., Forman, B. M., Thummel, K. E. and Blumberg, B. (2006) Mutual repression between steroid and xenobiotic receptor and NF-kappaB signaling pathways links xenobiotic metabolism and inflammation. *The Journal of clinical investigation*, 116, 2280-2289.








5 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

ac	<i>Anolis carolinensis</i>
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
CAR	<i>constitutive androstane receptor</i> , Konstitutiver-Androstane-Rezeptor
CARLA	<i>coactivator-dependent receptor ligand assay</i>
CITCO	(6-(4-Chlorophenyl)imidazol[2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehyde O-(3,4-dichlorobenzyl)oxime)
cj	<i>Coturnix japonica</i>
Cyp	Cytochrom P450
DBD	DNA-Bindedomäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	<i>direct repeat</i>
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
ER	<i>everted repeat</i>
FPKM	<i>fragments per kilobase of exon per million fragments mapped</i>
fw	<i>forward</i> , vorwärts
g	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierende Protein
gg	<i>Gallus gallus</i>
H	Helix
hs	<i>Homo sapiens</i>
Hz	Hertz
IR	<i>inverted repeat</i>
kb	Kilobasen
LBD	Ligandenbindedomäne
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
min	Minuten
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuche
NR	nukleäre Rezeptoren
PCN	Pregnenolon-16alpha-Carbonitril
Pregnanedion	5b-Pregnane-3,20-dion
PXR	Pregnane-X-Rezeptor
qPCR	Quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure

Rv	<i>reverse</i> , rückwärts
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SV	Splice-Variante
TCPOBOP	1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen
UpM	Umdrehungen pro Minute
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
vgl.	vergleiche
wt	Wildtyp
xl	<i>Xenopus laevis</i>
xt	<i>Xenopus tropicalis</i>

Tabelle 5.2: Genexpressionsänderungen von Cyp2b10*

A		F ₀ -Weibchen	F ₀ -Männchen	abstammend von F ₀ -Weibchen		abstammend von F ₀ -Männchen	
		F ₁ -Weibchen	F ₁ -Männchen				
	1)	3228-fach	1558-fach				
↓ 3 Monate							
	2)	3,3-fach	27-fach				
↓							
	3)	91-fach	120-fach	1,5-fach	0,3-fach		
↓							
	4)	2,4-fach	7-fach	0,6-fach	0,28-fach		
B		F ₀ -Weibchen	F ₀ -Männchen	abstammend von F ₀ -Weibchen		abstammend von F ₀ -Männchen	
		F ₁ -Weibchen	F ₁ -Männchen				
	5)	177-fach	5615-fach				
↓ 6 Wochen							
	6)	40-fach	298-fach				
↓							
	7)	748-fach	539-fach				

* Genexpressionsänderungen von Cyp2b10 ermittelt mit qPCR und anschließender $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode. A Tiere welche als Neugeborene mit TCPOBOP injiziert wurden, B mit TCPOBOP injizierte Adulttiere

Tabelle 5.3: Anzahl der Versuche, SD sowie SEM für xlCARa Mutationen

Mutation in xlCARa	basale Aktivität					Artemisinin					Fenofibrat					Pregnanedione				
	Induktions- änderung *	MW (log2)	SD	SEM	n	Induktions- änderung *	MW (log2)	SD	SEM	n	Induktions- änderung *	MW (log2)	SD	SEM	n	Induktions- änderung *	MW (log2)	SD	SEM	n
Leu155Thr	0,79	-0,37	0,33	0,12	8	1,17	0,09	0,69	0,24	8	1,00	-0,03	0,35	0,12	8	1,04	0,00	0,46	0,16	8
Leu155Glu & Pro253Ser	0,72	-0,51	0,38	0,13	8	0,72	-0,52	0,41	0,15	8	0,92	-0,24	0,67	0,24	8	0,86	-0,30	0,56	0,20	8
Ile242Val	0,66	-0,72	0,58	0,12	22	0,37	-1,56	0,66	0,14	22	0,50	-1,30	0,93	0,20	22	0,89	-0,48	1,03	0,22	22
Met272Val & Met316Phe	11,73	3,51	0,38	0,11	12	0,26	-2,15	0,80	0,23	12	0,32	-1,75	0,65	0,19	12	0,11	-3,22	0,38	0,11	12
Tyr283Phe	0,99	-0,13	0,63	0,13	22	1,52	0,19	1,16	0,25	22	1,59	0,13	1,16	0,25	22	1,43	0,17	1,02	0,22	22
His295Leu	1,04	-0,09	0,69	0,15	21	1,13	-0,14	0,96	0,21	21	0,81	-0,60	0,97	0,21	21	1,43	0,22	0,95	0,21	21
Lys296Arg	0,96	-0,08	0,31	0,11	8	0,97	-0,10	0,48	0,17	8	0,75	-0,53	0,62	0,22	8	1,06	0,04	0,37	0,13	8
Lys296Leu	0,62	-0,75	0,46	0,16	8	0,96	-0,14	0,52	0,18	8	0,67	-0,63	0,40	0,14	8	1,37	0,35	0,62	0,24	7
Phe297Tyr	1,24	0,10	0,79	0,17	22	1,40	0,15	1,06	0,23	22	1,14	-0,15	1,09	0,23	22	1,19	-0,14	1,13	0,24	22
Thr305Val	8,55	2,94	0,68	0,15	20	0,46	-1,35	0,85	0,19	21	0,35	-1,79	0,84	0,18	22	0,23	-2,44	1,07	0,23	22
Cys339Ala	1,00	-0,03	0,27	0,10	8	0,73	-0,65	0,83	0,29	8	0,75	-0,50	0,50	0,18	8	0,88	-0,25	0,53	0,19	8
Ser410Ala	0,93	-0,15	0,42	0,15	8	1,09	0,01	0,62	0,22	8	1,28	0,29	0,47	0,17	8	1,14	0,12	0,51	0,18	8
Met272Val & Met316Phe & Ser410Ala	8,98	2,75	1,29	0,26	24	0,21	-2,63	1,13	0,23	24	0,55	-1,12	0,92	0,19	24	0,14	-3,08	0,95	0,19	24
Wildtyp	1,00	0,00	0,00	0,00	24	1,00	0,00	0,00	0,00	24	1,00	0,00	0,00	0,00	24	1,00	0,00	0,00	0,00	24









* Mittelwert vor der Logarithmisierung

Tabelle 5.4: Anzahl der Versuche, SD sowie SEM für hsCAR Mutationen

Mutation in xlCARa	basale Aktivität					Artemisinin					Fenofibrat					Pregnanedione				
	Induktions- änderung *	MW (log2)	SD	SEM	n	Induktions- änderung *	MW (log2)	SD	SEM	n	Induktions- änderung *	MW (log2)	SD	SEM	n	Induktions- änderung *	MW (log2)	SD	SEM	n
Thr116Leu	0,66	-0,60	0,14	0,05	8	1,10	0,09	0,37	0,13	8	1,01	0,01	0,18	0,06	8	1,41	0,39	0,56	0,20	8
Thr116Glu & Pro180Ser	0,46	-1,15	0,33	0,12	8	1,00	-0,01	0,17	0,06	8	1,04	0,00	0,42	0,15	8	1,63	0,58	0,63	0,22	8
Arg223Lys	0,74	-0,46	0,29	0,10	8	1,18	0,22	0,28	0,10	8	1,47	0,43	0,61	0,22	8	1,69	0,62	0,66	0,23	8
Arg223Leu	0,68	-0,61	0,39	0,14	8	1,11	0,05	0,57	0,20	8	1,10	0,03	0,61	0,22	8	1,84	0,59	0,88	0,31	8
Ser337Ala	0,78	-0,80	1,35	0,39	12	1,66	0,61	0,63	0,18	12	2,16	0,64	1,20	0,35	12	1,83	0,56	1,12	0,32	12
Wildtyp	1,00	0,00	0,00	0,00	12	1,00	0,00	0,00	0,00	12	1,00	0,00	0,00	0,00	12	1,00	0,00	0,00	0,00	12

* Mittelwert vor der Logarithmisierung

Tabelle 5.5: alphabetische Top 15-Liste der direkt, langfristig und generationsübergreifend differentiell exprimierten Gene nach TCPOBOP bzw. PCN Induktion

TCPOBOP								PCN							
F ₀				F ₁				F ₀				F ₁			
															
Genname	Expressions- änderung*	Genname	Expressions- änderung*	Genname	Expressions- änderung*	Genname	Expressions- änderung*	Genname	Expressions- änderung*	Genname	Expressions- änderung*	Genname	Expressions- änderung*	Genname	Expressions- änderung*
gesteigerte Genexpression gegenüber der jeweiligen DMSO-Kontrolle:															
1700067K01Rik	28	1810053B23Rik	90	Acta1	3148	2310039L15Rik	4	Bmp8b	30	1810053B23Rik	9	2310039L15Rik	6	Dusp8	6
6030405A18Rik	47	Apol10b	18	Actn2	709	Batf2	9	Cyp26a1	17	C4bp-ps1	8	9230114K14Rik	3	Il1rn	8
Aldh1a7	36	Arid5a	12	Amd1,Amd2	9870	Bhlhe41	3	Cyp2b10	96	Cish	7	C130083M11Rik	4	Lcn2	18
Cyp26a1	40	Cyp2b10	29	Atp2a1	498	Cfd	5	Cyp2c29	50	Egr1	9	Cst9	4	Moap1	19473
Cyp2b10	2150	Hspa1a	14	Cacna1s	153	Cyp2b10	5	Cyp2c55	124	Fam107a	53	Fabp3	3	Mt1	8
Cyp2c29	2320	Meg3	11	Casq1	121	Ddit4l	3	Dmbt1	21	Foxq1	7	Glpr2	4	Mt2	25
Cyp2c50	47	Mir1906-2	11	Ckm	723	Hba-a1,Hba-a2	9	Gsta1	184	Gadd45g	12	Gm5901	5	Niacr1	6
Cyp2c55	572	Mir770	11	Cyp2b10	156	Hexim2	4	Gstm3	57	Gm129	9	Gm765	3	Rdh1	11
Gsta1	34	Moxd1	11	Fabp3	269	Mdk	5	Hist1h1a	27	Ifitm5	8	Gm9733	3	Retnlg	8
Gstm3	40	Mt1	12	Ldb3	151	Npb	6	Lrrc15	29	Myc	9	Hesx1	3	Saa3	16
Neb1	65	Mt2	17	Myh1	617	Rad18	4	Orm1	89	Nmb	8	Hist1h2bg	3	Serpina3h	6
Pnliprp1	53	Mup5	9	Myh7	243	Rnaset2a,Rnase	6868	Orm2	38	Pnpl3	10	Itga2	3	Tchh	6
Serpina6	36	Rian	11	Myh8	1004	Rpl31-ps12	3	Ptges	36	Socs1	14	Lcor	3	Tifa	6
Sult1e1	67	Socs1	45	Sypl2	233	Tchh	4	Rmrp	67	Tnfaip3	9	Rps27	29	Tlr2	11
Tmprss7	34	Sult1e1	193	Tnnt3	414	Vpreb3	4	Rn45s	18	Tnnc1	10	Tgoln2	4	Xlr4b	7
verminderte Genexpression gegenüber der jeweiligen DMSO-Kontrolle:															
5730405O15Rik	-9	4930413G21Rik	-6	2810403D21Rik	-5	1700015E13Rik	-8	5730420D15Rik	-43	Amd1,Amd2	-3629	4930413G21Rik	-7	Amd1,Amd2	-3264
Amd1	-3077	Ar	-7	4930549G23Rik	-5	2010001M09Rik	-4	A630076J17Rik	-38	Arntl	-5	Apol9b	-6	Cenpp	-11
BC089597	-15	Ccnb1	-6	Ankrd55	-7	Bcl2a1a	-6	AW549542	-30	BC028528	-6	Chac1	-11	Cyp2b9	-17
Cacng1	-11	Cfd	-23	Chac1	-5	Ccl2	-8	Cacng1	-18	Ccnb1	-8	Ctrb1	-8	Cyp2c69	-6
Ces1f	-6	Cldn7	-5	Cidec	-6	Ccl8	-6	Clec2h	-16	Cdc20	-9	Dmbt1	-53	Cyp2d12	-40
Crygn	-7	Cyp4a10	-6	Erdr1	-5	Cd40	-5	Csrp3	-12	Ckap2l	-5	Fgf21	-7	Egr1	-5
Cyp3a41b	-6	Cyp4a14	-29	Fgf21	-9	Cyp2b9	-13	Cym	-16	Esco2	-6	Gm4841	-6	Gm10804	-9
Cyp4f39	-12	Gm9781	-9	Gm15441	-7	Cyp2c40	-4	Cyp3a57	-14	Fam183b	-5	Hsd3b6	-7	Gm11517	-5
Dnaic1	-8	Lcn13	-5	Hamp	-14	Cyp2c69	-6	Gbp11	-12	Gm6525	-6	Nrtn	-10	Hba-a1,Hba-a2	-352
Hsd3b5	-16	LOC622167	-6	Hamp2	-14	E130310I04Rik	-6	Gja10	-13	Hba-a1,Hba-a2	-326	Pih1d2	-6	Mup5	-81
lqca	-6	Msln	-7	Hist1h2bj	-5	Ear12,Ear2	-782	Hsd3b5	-29	Hist1h1d	-6	Plk5	-6	Rplp2-ps1	-4
Rnaset2a	-6112	Raet1a,Raet1b	-6	Hsd3b6	-8	Gm6525	-6	Osr1	-12	Hist1h1e	-5	Ppp1r3g	-6	Rps27	-22
Rps27	-17	Rtn2	-10	Plekhn1	-5	Insl3	-21	Prok1	-32	Pitx3	-7	Reg1	-17	Tff3	-12
Sftpd	-6	Tgoln2	-15	Prp3	-7	Mup5	-10	Rps27	-18	Plk1	-5	Scand1	-7	Trem2	-5
Slc24a4	-8	Ube2c	-6	Sap25	-5	Nup62cl	-7	Serpina7	-15	Tgoln2	-15	Spink4	-9	Wfdc15b	-5

*Angegeben sind die x-fachen Genexpressionsänderungen gegenüber der jeweiligen DMSO-Kontrolle, welche mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung bestimmt wurden..

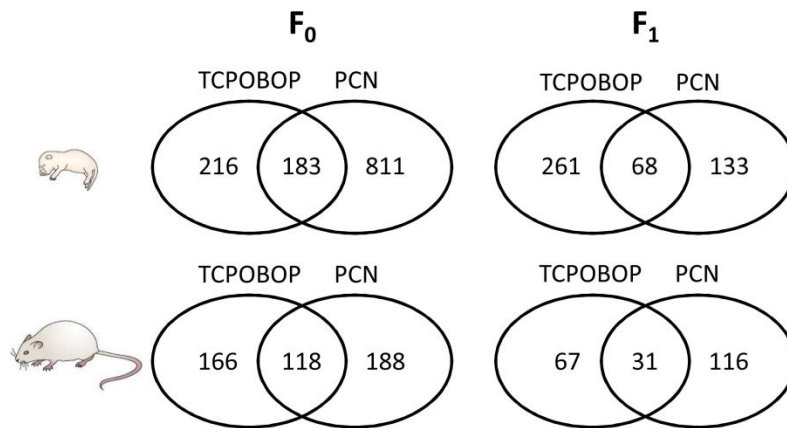


Bild 5.1: Anzahl der gemeinsamen Zielgene von CAR und PXR

Tabelle 5.6: Anzahl der Reads sowie detektierte Gene bei der Hochdurchsatz-RNA-Sequenzierung

Probe	Anzahl der Reads pro Sequenzierrichtung	Anzahl der detektierten Gene von 23747 Genen (cufflinks)
F ₀ -Neugeborene DMSO	je 29,5 Millionen	16626
F ₀ -Neugeborene TCPOBOP	je 31,1 Millionen	16684
F ₀ -Neugeborene PCN	je 41,1 Millionen	16854
F ₀ -Adulttiere DMSO	je 25,5 Millionen	15573
F ₀ -Adulttiere TCPOBOP	je 30,7 Millionen	15500
F ₀ -Adulttiere PCN	je 37,5 Millionen	15740
F ₁ -Neugeborene DMSO	je 41,1 Millionen	16995
F ₁ -Neugeborene TCPOBOP	je 31,2 Millionen	17013
F ₁ -Neugeborene PCN	je 36,7 Millionen	16898
F ₁ -Adulttiere DMSO	je 24,9 Millionen	15459
F ₁ -Adulttiere TCPOBOP	je 47,5 Millionen	16005
F ₁ -Adulttiere PCN	je 28,4 Millionen	15460

Tabelle 5.7: Tierzahlen pro Versuchsgruppe mit Standardabweichung für injizierte Neugeborene

		DMSO		TCPOBOP		PCN		
		n	SD	n	SD	n	SD	
a	F ₀ Neugeborene	Weibchen	3	0,30	3	212,60	4	14,89
		Männchen	3	1,84	4	821,10	4	6,48
	F ₀ Adulttiere	Weibchen	2	28,57	4	61,86	1	0,00
		Männchen	2	1,01	2	94,12	2	0,02
b	F ₁ Neugeborene	Weibchen (von F ₀ Weibchen abstammend)	0		1	0,00	1	0,00
		Männchen (von F ₀ Weibchen abstammend)	3	0,55	2	113,40	3	0,13
		Weibchen (von F ₀ Männchen abstammend)	2	0,36	8	0,96	3	0,09
		Männchen (von F ₀ Männchen abstammend)	3	0,46	3	0,45	0	
	F ₁ Adulttiere	Weibchen (von F ₀ Weibchen abstammend)	4	10,09	6	11,63	4	5,72
		Männchen (von F ₀ Weibchen abstammend)	6	2,34	6	3,68	3	0,82
		Weibchen (von F ₀ Männchen abstammend)	4	12,77	7	13,04	3	5,42
		Männchen (von F ₀ Männchen abstammend)	3	0,19	5	1,09	3	1,57
c	F ₂ Neugeborene	Weibchen (von F ₀ Weibchen sowie F ₁ Weibchen abstammend)	6	0,92	7	4,51		
		Männchen (von F ₀ Weibchen sowie F ₁ Weibchen abstammend)	6	1,52	6	0,93		
		Weibchen (von F ₀ Weibchen sowie F ₁ Männchen abstammend)	6	0,92	5	0,52		
		Männchen (von F ₀ Weibchen sowie F ₁ Männchen abstammend)	5	1,01	4	0,87		
		Weibchen (von F ₀ Männchen sowie F ₁ Weibchen abstammend)	6	0,52	7	2,66		
		Männchen (von F ₀ Männchen sowie F ₁ Weibchen abstammend)	5	0,60	6	3,34		
		Weibchen (von F ₀ Männchen sowie F ₁ Männchen abstammend)	3	1,50	6	0,87		
		Männchen (von F ₀ Männchen sowie F ₁ Männchen abstammend)	4	1,75	6	2,54		
	F ₂ Adulttiere	Weibchen (von F ₀ Weibchen sowie F ₁ Weibchen abstammend)	4	3,36	3	1,91		
		Männchen (von F ₀ Weibchen sowie F ₁ Weibchen abstammend)	5	0,45	3	0,10		
		Weibchen (von F ₀ Weibchen sowie F ₁ Männchen abstammend)	3	5,15	3	6,11		
		Männchen (von F ₀ Weibchen sowie F ₁ Männchen abstammend)	3	0,56	3	0,86		
		Weibchen (von F ₀ Männchen sowie F ₁ Weibchen abstammend)	2	0,93	3	2,51		
		Männchen (von F ₀ Männchen sowie F ₁ Weibchen abstammend)	4	0,73	3	0,35		
		Weibchen (von F ₀ Männchen sowie F ₁ Männchen abstammend)	5	5,60	4	6,88		
		Männchen (von F ₀ Männchen sowie F ₁ Männchen abstammend)	3	0,81	2	0,28		

Tabelle 5.8: Tierzahlen pro Versuchsgruppe mit Standardabweichung für injizierte Adulttiere

			DMSO		TCPOBOP		PCN	
			n	SD	n	SD	n	SD
a	F ₀ nach 3 Tage	Weibchen	2	19,94	2	270,80	2	3,84
		Männchen	2	1,10	1	0,00	2	15,58
	F ₀ nach 6 Wochen	Weibchen	2	4,05	2	288,70	2	1,86
		Männchen	2	0,26	2	39,89	2	0,41
b	F ₁ Neugeborene	Weibchen (von F ₀ Weibchen abstammend)	10	0,57	5	157,10		
		Männchen (von F ₀ Weibchen abstammend)	10	0,60	10	176,50		

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Mathäs, M., Burk, O., Qiu, H., Nussag, C., Godtel-Armbrust, U., Baranyai, D., Deng, S., Romer, K., Nem, D., Windshugel, B. and Wojnowski, L. (2012) Evolutionary History and Functional Characterization of the Amphibian Xenosensor CAR. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md, 26, 14-26)

Dank