
Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1. Der Fremdstoffmetabolismus..... | 1 |
| 1.1.1. Die Notwendigkeit, Fremdstoffe zu eliminieren | 1 |
| 1.1.2. Das Cytochrom-P450-Enzysystem..... | 3 |
| 1.1.3. Induktion und Hemmung als Mechanismen der Anpassung..... | 4 |
| 1.2. Die Induktion von CYP2B1 durch Phenobarbital als Modell | 6 |
| 1.2.1. „Phenobarbital-ähnliche“ Enzyminduktion..... | 6 |
| 1.2.2. Bekannte Modulatoren der CYP2B1-Induktion..... | 7 |
| 1.3. Ziel dieser Arbeit | 9 |
| 2. Material und Methoden..... | 12 |
| 2.1. Material | 12 |
| 2.1.1. Versuchstiere | 12 |
| 2.1.2. Chemikalien | 12 |
| 2.1.3. Zellkulturreagenzien und -zusätze | 12 |
| 2.1.4. Plasmid-Vektoren und Bakterien..... | 13 |
| 2.1.5. Oligonukleotide..... | 13 |
| 2.1.6. Molekularbiologische Enzyme und Kits | 13 |
| 2.1.7. Reagenzien und Materialien für die DNA- und RNA-Analytik..... | 14 |

| | |
|--|----|
| 2.1.8. Reagenzien und Materialien für die Protein-Analytik..... | 15 |
| 2.1.9. Verbrauchsmaterialien..... | 16 |
| 2.1.10. Geräte..... | 17 |
| 2.2. Zellkultur..... | 20 |
| 2.2.1. Sterilisation von Materialien und Lösungen..... | 20 |
| 2.2.2. Die Zellkulturmedien MX-82 und MX-83..... | 20 |
| 2.2.3. Isolierung von Hepatozyten der Ratte..... | 21 |
| 2.2.4. Aussaat und Kultur primärer Hepatozyten der Ratte..... | 22 |
| 2.2.5. Gewinnung von Leberproben aus Phenobarbital-vorbehandelten Ratten..... | 24 |
| 2.3. Molekularbiologische und biochemische Methoden..... | 24 |
| 2.3.1. Amplifikation des CYP2B1-Promotors mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion..... | 24 |
| 2.3.2. Generierung von Deletionskonstrukten mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion..... | 26 |
| 2.3.3. Nachweis und Aufreinigung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese..... | 29 |
| 2.3.4. Ligation von PCR-Produkten in den pCR-XL-TOPO-Vektor..... | 31 |
| 2.3.5. Ligation von DNA-Fragmenten in pGL3-Vektoren..... | 31 |
| 2.3.6. Ligation von Doppelstrang-Oligonukleotiden in den pGL3-Promoter-Vektoren..... | 33 |
| 2.3.7. Transformation von E. coli mit pCR-XL-, pGL3- oder pRL-Vektoren..... | 35 |
| 2.3.8. „Mini“-Präparation von Plasmid-DNA und Analyse der Produkte..... | 37 |
| 2.3.9. „Maxi“-Präparation von Plasmid-DNA..... | 37 |
| 2.3.10. Sequenzieren von pCR-XL- und pGL3-Vektoren..... | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.11. Transfektion von primären Hepatozyten mit pGL3- und pRL-Vektoren | 39 |
| 2.3.12. Bestimmung der Luciferase-Aktivität in Zelllysaten..... | 40 |
| 2.3.13. Isolierung von RNA..... | 40 |
| 2.3.14. Auftrennung und Transfer von RNA (Northern Blotting) | 42 |
| 2.3.15. Spezifischer Nachweis von mRNA durch Hybridisierung mit Oligonukleotiden..... | 44 |
| 2.3.16. Präparation von Kernprotein-Extrakten | 46 |
| 2.3.17. Messung des Proteingehalts von Kernprotein-Extrakten | 47 |
| 2.3.18. Auftrennung und Transfer von Proteinen (Western Blotting) | 48 |
| 2.3.19. Immunchemischer Nachweis von Proteinen..... | 52 |
| 2.3.20. Nachweis spezifischer Kernprotein-DNA-Wechselwirkungen (EMSA)..... | 53 |
| 2.4. Statistische Auswertung und Datenbankrecherche | 56 |
| 2.4.1. Statistische Auswertung und Darstellung von Messwerten | 56 |
| 2.4.2. Datenbankrecherche..... | 57 |
| 3. Ergebnisse | 58 |
| 3.1. Herstellung von CYP2B1-Promotor-Reportergen-Vektoren | 58 |
| 3.1.1. Klonierung eines 2.7 kb-Fragments des CYP2B1-Promotors der Ratte | 58 |
| 3.1.2. Herstellung von mutierten und deletierten Promotor-Reportergen-Vektoren..... | 60 |
| 3.2. Transfektion primärer Hepatozyten mit CYP2B1-Promotor-Reportergen-Vektoren | 60 |
| 3.2.1. Nachweis der CYP2B1-Induktion durch Phenobarbital auf transkriptioneller Ebene..... | 60 |
| 3.2.2. Aktivität des CYP2B1-Promotors unter Einfluss von endogenen Hemmstoffen..... | 63 |

| | |
|--|------------|
| 3.2.3. Aktivität des <i>CYP2B1</i> -Promotors unter Einfluss von Reaktiven Sauerstoff-Spezies... | 65 |
| 3.2.4. Eingrenzen responsiver Promotor-Regionen mit Hilfe von Deletionskonstrukten | 67 |
| 3.2.5. Untersuchung distaler Enhancer-Bereiche mit Hilfe von Mutationskonstrukten | 71 |
| 3.3. Untersuchungen zur Beteiligung der Kernrezeptoren CAR und RXR | 79 |
| 3.3.1. DNA-Kernprotein-Wechselwirkungen im Bereich des NR1-Elements..... | 79 |
| 3.3.2. Paralleler mRNA-Nachweis von CAR und <i>CYP2B1</i> im Northern Blot..... | 85 |
| 4. Diskussion | 87 |
| 4.1. Transkriptionelle Aktivierung der <i>CYP2B1</i> -Expression..... | 87 |
| 4.2. Hemmung der <i>CYP2B1</i> -Induktion durch endogene Wachstumsfaktoren | 92 |
| 4.3. Regulation der <i>CYP2B1</i> -Induktion durch redoxaktive Modulatoren..... | 94 |
| 4.4. Wachstumsfaktoren und Redox-Status: ein gemeinsamer Signaltransduktionsweg? | 97 |
| 4.5. NAC: Konsequenzen für die Arzneimitteltherapie? | 98 |
| 5. Zusammenfassung..... | 100 |
| 6. Literaturverzeichnis | 102 |
| 7. Anhang..... | 114 |
| 7.1. Sequenzen der <i>pGL3-Basic</i> -Konstrukte..... | 114 |
| 7.2. Sequenzen der <i>pGL3-SV40-Promoter</i> -Konstrukte | 120 |
