

**Einfluss von Dexamethason auf die CYP-Induktion  
durch den Modellinduktor Phenobarbital an  
Rattenleberschnitten in vitro**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität

Von  
Stefanie Rohländer  
geboren am 10.07.1981 in Sangerhausen

Gutachter:

1. PD Dr. med. Reinhild Glöckner, Jena
2. PD Dr. med. dent. Florentine Jahn, Jena
3. PD Dr. med. Martin Kretschmar, Altenburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.06.2011

## Abkürzungsverzeichnis

BNF	Beta-Naphthoflavon
bp	Basenpaare
CAR	Constitutive Androstane Receptor
CYP	Cytochrom-P450
CO	Kohlenmonoxid
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DEXA	Dexamethason
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <u>d</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
ER	endoplasmatisches Retikulum
G-6-P	Glucose-6-Phosphat
GRE	Glucocorticoid Response Element
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KM	Körpermasse
KH-Puffer	Krebs-Henseleit-Puffer
mRNA	Boten-RNA ( <u>m</u> essenger <u>R</u> NA)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PB	Phenobarbital
PBRE	PB-Responsive Enhancer
NR	nukleäre Rezeptoren
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PROD	7-Pentoxyresorufin-O-Depentylierung
PXR	Pregnane-X-Receptor
RNA	Ribonukleinsäure ( <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid)
r.p.m.	Umdrehungen pro Minute ( <u>r</u> evolutions per <u>m</u> inute)
RT	Reverse Transkriptase/ Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SRC-1	Steroid Co-Aktivator 1
Sp1	Transkriptionsfaktor
TCA	Trichloressigsäure
TH	Testosteronhydroxylierung
16β-, 2β-TH	16β-, 2β-Testosteronhydroxylierung

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>3</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>6</b>
<b>2 EINLEITUNG</b> .....	<b>8</b>
2.1 Bedeutung der Biotransformation.....	8
2.2 Das CYP-abhängige Monooxygenasesystem .....	8
2.3 CYP-Induktion.....	10
2.4 CYP2B-Induktion .....	11
2.5 Untersuchungsmodelle zum Nachweis einer CYP-Induktion .....	13
2.5.1 In-vivo-Modell .....	13
2.5.2 In-vitro-Modelle .....	14
2.6 CYP2B-Induktion in Präzisionsleberschnitten .....	15
<b>3 ZIELSTELLUNG</b> .....	<b>19</b>
<b>4 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>21</b>
4.1 Versuchstiere.....	21
4.2 Präparation der Leberschnitte .....	21
4.3 Inkubation der Leberschnitte .....	22
4.4 Induktionsnachweis auf Enzymaktivitätsebene .....	23
4.4.1 7-Pentoxoresorufin-O-Depentylierung (PROD).....	24
4.4.2 Testosteronhydroxylierung (TH).....	24
4.4.3 Proteinbestimmung.....	26
4.5 Induktionsnachweis auf mRNA- Ebene.....	27
4.5.1 RNA-Isolierung.....	27
4.5.2 Reverse Transkription (RT).....	28
4.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
4.5.4 Kompetitive RT-PCR.....	30
4.5.5 Gelelektrophorese.....	30
4.5.6 Auswertung .....	31
4.6 Statistik .....	31
<b>5 ERGEBNISSE</b> .....	<b>32</b>
5.1 CYP2B1-Induktion in vitro durch PB in Leberschnitten un behandelter Ratten .....	32
5.2 CYP2B1-Induktion in vitro durch PB in Leberschnitten DEXA-vorbehandelter Ratten.....	33
5.2.1 Kontrolle des DEXA-Effekts: 2 $\beta$ -TH.....	33
5.2.2 CYP2B1-Aktivität.....	34
5.2.3 CYP2B1-mRNA.....	35

<b>5.3</b>	<b>Einfluss von DEXA in vitro auf die CYP2B1-Induzierbarkeit in Leberschnitten .....</b>	<b>36</b>
5.3.1	PB-Exposition gleichzeitig mit DEXA in vitro .....	36
5.3.2	PB-Exposition nach vorangegangener DEXA-Exposition in vitro .....	42
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>47</b>
<b>6.1</b>	<b>CYP2B1-Induktion in vitro durch PB in Leberschnitten unbehandelter Ratten .....</b>	<b>47</b>
<b>6.2</b>	<b>CYP2B1-Induktion in vitro durch PB in Leberschnitten DEXA-vorbehandelter Ratten.....</b>	<b>49</b>
<b>6.3</b>	<b>Einfluss von DEXA in vitro auf die CYP2B1-Induzierbarkeit in Leberschnitten .....</b>	<b>52</b>
6.3.1	PB-Exposition gleichzeitig mit DEXA in vitro .....	53
6.3.2	PB-Exposition nach vorangegangener DEXA-Exposition in vitro .....	55
<b>6.4</b>	<b>Ausblick auf die Nutzung von Präzisionsleberschnitten .....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN.....</b>	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>62</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>75</b>

## 1 Zusammenfassung

Der Zweck der Untersuchungen bestand darin zu prüfen, inwiefern Schwankungen im hepatischen Cytochrom-P450 (CYP)-Expressionsmuster, z.B. ausgelöst durch CYP-Induktoren *in vivo*, Auswirkungen auf *In-vitro*-Testungen der CYP-Induktion haben können. Bei der angestrebten Nutzung von humanem Lebergewebe ist für solche Tests mit großen Unterschieden ohne Einflussmöglichkeiten bezüglich Gewebeeigenschaften zu rechnen.

In vorliegender Arbeit wurde der Teilaspekt der Phenobarbital (PB)-abhängigen Induktion des CYP2B1 unter dem Einfluss des CYP3A-Modellinduktors Dexamethason (DEXA) an Leberschnitten weiblicher Ratten untersucht. Im Mittelpunkt stand dabei die *In-vitro*-Induktion des CYP2B1-Isoenzym durch PB in Leberschnitten nach Vorbehandlung der Ratten mit DEXA *in vivo* (4mg/kg Körpermasse (KM) an 3 aufeinander folgenden Tagen). Neben diesem *In-vivo*-Versuch wurde in weiteren *In-vitro*-Versuchsreihen die CYP2B1-Induktion an Rattenleberschnitten nach alleiniger PB-Exposition, nach simultaner DEXA- und PB-Exposition und nach sukzessiver DEXA- und PB-Exposition geprüft. PB wurde in den Konzentrationen von 5, 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Für DEXA wurden die Konzentrationen 0,01  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  gewählt, um die Interaktion mit einem schwachen oder starken CYP3A-Induktor zu simulieren. Das Ausmaß der PB-abhängigen CYP2B1-Induktion wurde auf Enzymaktivitätsebene mit Hilfe der Modellreaktionen Pentoxyresorufin-O-Depentylierung (PROD) und 16 $\beta$ -Testosteronhydroxylierung (16 $\beta$ -TH) bestimmt. Desweiteren erfolgten Bestimmungen der CYP2B1-mRNA-Expression. Ergänzend wurde die Induktion des CYP3A1-Isoenzym durch DEXA anhand der 2 $\beta$ -Testosteronhydroxylierung (2 $\beta$ -TH) kontrolliert.

Die alleinige *In-vitro*-Inkubation der Rattenleberschnitte mit PB über 24 Stunden zeigte eine konzentrationsabhängige Steigerung der PROD bis auf das 4fache bei Einsatz von 100  $\mu\text{M}$  PB.

Die *In-vivo*-Versuchsserie ergab, dass in den Leberschnitten DEXA-vorbehandelter Ratten nach 24stündiger *In-vitro*-Inkubation mit PB höhere CYP2B1-abhängige Enzymaktivitäten erreicht werden konnten als in Leberschnitten un behandelter Ratten. Mit Einsatz von 100  $\mu\text{M}$  PB wurden Steigerungen der PROD und 16 $\beta$ -TH auf das 13fache beobachtet. Dies geschah vor dem Hintergrund einer ca. 10fachen Steigerung der CYP3A1-Aktivität (2 $\beta$ -TH)

in den Rattenlebern, die aber im Laufe der 24stündigen Inkubation der Leberschnitte weitgehend wieder verschwand. Auf mRNA-Ebene wirkte sich die DEXA-Vorbehandlung weniger aus, die Induktion mit PB blieb wie in Leberschnitten unbehandelter Tiere erhalten.

In allen In-vitro-Versuchsreihen wurde nach simultanem bzw. sukzessivem Einsatz von DEXA und PB eine CYP2B1-Induktion auf Enzymaktivitätsebene ebenfalls sicher nachgewiesen. Die mittleren Absolutwerte der PROD und 16 $\beta$ -TH lagen nach simultaner und sukzessiver Zugabe von 0,01  $\mu$ M DEXA und PB in ähnlichen Bereichen. Bei simultaner Exposition wirkte sich die DEXA-Konzentration von 0,01  $\mu$ M weder auf Aktivitäts- noch auf mRNA-Ebene auf die CYP2B1-Induktion aus. Die Einwirkung von 0,01  $\mu$ M DEXA vor PB schien die CYP2B1-Induktion vor allem auf mRNA-Ebene sogar etwas zu verstärken, ohne dass ein Effekt auf die CYP3A1-Aktivität ausgelöst worden wäre. Eine Veränderung der CYP3A1-Aktivität hatte erwartungsgemäß nicht stattgefunden.

Auch nach simultaner und sukzessiver Inkubation mit 1  $\mu$ M DEXA (nachweisbare CYP3A1-Induktion) und PB unterschieden sich die CYP2B-abhängige PROD und 16 $\beta$ -TH beider Versuchsreihen nicht signifikant voneinander. Es zeigte sich eine potenzierende Wirkung auf Aktivitätsebene, die aber auf mRNA-Ebene nicht beobachtet wurde. Stattdessen war die CYP2B1-mRNA-Konzentration nach sukzessiver Einwirkung von DEXA und PB vermindert, die Induktion blieb aber auf niedrigerem Niveau auslösbar.

Abschließend kann gesagt werden, dass sich Präzisionsleberschnitte zum Nachweis einer CYP2B1-Induktion auch unter dem Einfluss von DEXA prinzipiell eignen. DEXA-vorinduziertes Lebergewebe kann zu In-vitro-Untersuchungen der CYP2B-Induktion verwendet werden. Potentielle CYP3A-Induktoren scheinen die Induktion der CYP2B-Aktivität nicht zu stören und deren Nachweis nicht zu maskieren. Im Hinblick auf die Nutzung humanen Materials zu Studien der CYP-Induktion ist es denkbar, Schnitte menschlicher Leber zu diesem Zweck verwenden zu können, selbst nach bekannter Glucocorticoidtherapie des Gewebstdonators oder einer in vivo stattgefundenen CYP3A-Induktion.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Bedeutung der Biotransformation**

Jeder Organismus ist einer Vielzahl von chemischen Verbindungen ausgesetzt, die seine biologischen Funktionen beeinflussen können. So nimmt der Mensch allein mit der Nahrung neben wichtigen Nährstoffen viele nichtverwertbare oder gar schädliche Fremdstoffe (Xenobiotika) auf. Diese besitzen oft einen lipophilen Charakter, wodurch sie leicht resorbiert, aber schwer in unveränderter Form eliminiert werden können und zur Kumulation neigen. Durch die Umwandlung in hydrophile Verbindungen kann die Exkretion erleichtert werden. Die unter dem Begriff Biotransformation verstandene Umwandlung von lipophilen Substanzen, die sowohl Xenobiotika als auch körpereigene Verbindungen betrifft, findet zum Großteil in der Leber statt, in geringerem Maß auch in anderen Organen. Sie läuft in zwei Phasen ab. In der Phase I werden funktionelle Gruppen in das unpolare Molekül eingeführt oder freigelegt (Funktionalisierungsphase). Dies geschieht meist durch Oxidation, Reduktion, Hydrolyse und Hydratation. Eine Phase-I-Reaktion ist oft Voraussetzung für die zweite Phase der Biotransformation, in der polare Gruppen übertragen werden. In den meisten Fällen wird das entstehende Endprodukt in seiner Wirkung abgeschwächt oder vollständig inaktiviert (Entgiftung). Mitunter entstehen aber auch Metabolite mit zytotoxischer oder genotoxischer Wirkung (Giftung). Daher ist es wichtig, die Metabolisierung von Xenobiotika aufzuklären.

Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit ist eine wichtige Enzymfamilie der Phase I, die Cytochrom-P450 (CYP)-abhängigen Monooxygenasen. Diese werden im Folgenden näher erläutert.

### **2.2 Das CYP-abhängige Monooxygenasesystem**

Die CYP-Enzyme sind überwiegend in die Membranen des endoplasmatischen Retikulums integriert und darüber hinaus auch in den inneren Membranen von Mitochondrien zu finden. Einige wenige liegen strukturungebunden als lösliche Enzyme vor (Mutschler et al. 2001).

Nach der erstmaligen Beschreibung eines fremdstoffmetabolisierenden Enzymsystem im endoplasmatischen Retikulum der Leber (Brodie et al. 1955) und der Entdeckung von Kohlenmonoxid (CO)-bindenden Membranpigmenten in Lebermikrosomen von Säugetie-

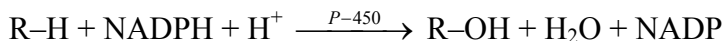


ren (Garfinkel 1958, Klingenberg 1958) wurden diese Pigmente als Hämoproteine identifiziert mit der Eigenschaft der prosthetischen Gruppe Hämin, in reduzierter Form und nach CO-Begasung bei einer Wellenlänge von 450 nm ein charakteristisches Absorptionsmaximum zu zeigen (Omura und Sato 1962, Omura und Sato 1964b, Omura und Sato 1964a). CYP-Enzyme wurden in Hefen, Bakterien, Pflanzen, Vögeln, Säugetieren und Menschen entdeckt (Lewis und Sheridan 2001) und haben sich vermutlich im Laufe der Evolution vor mehr als 2 Billionen Jahren noch vor der Trennung in Prokaryonten und Eukaryonten aus einem gemeinsamen Vorläufergen divergent entwickelten (Nebert und Gonzalez 1987, Nebert et al. 1989).

In den 1980er Jahren gelang es mittels moderner Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Techniken, Aminosäuresequenzen vieler CYP-Enzyme zu bestimmen und eine darauf aufbauende Klassifizierung vorzunehmen. 1987 führte Nebert das Nomenklatorsystem für die CYP-Superfamilie ein, welches fortlaufend erweitert wird (Nebert und Gonzalez 1987, Nelson et al. 1993, Nelson et al. 1996). Dem Symbol *CYP* folgt eine arabische Nummer, die die Familie der Gene mit einer Sequenzhomologie von >40 % umfasst. Innerhalb der Genfamilien erfolgt die Einteilung in Subfamilien, deren Gene zu >55 % identisch sind und mit einem großen Buchstaben gekennzeichnet werden (Nelson et al. 1996, Forth et al. 2005). Die sich anschließende zweite arabische Ziffer bezeichnet das individuelle Gen innerhalb einer Subfamilie, z.B. *CYP2B1*. Sind die Genprodukte, d.h. die Enzyme gemeint, wird der Ausdruck nicht kursiv angegeben. (Nelson et al. 1993, Nelson et al. 1996). Der aktuelle Klassifizierungsstand der CYP-Enzyme und die Entdeckung neuer CYP-Gensequenzen sind unter <http://drnelson.uthsc.edu/cytochromeP450.html> (18.11.2010) abrufbar.

Die CYP-Enzyme sind in der Lage, ausgehend von einem Sauerstoffmolekül ein Sauerstoffatom in ein Substrat einzufügen und das andere Atom zu Wasser zu reduzieren (Gibson und Skett 1994). Zum CYP-System gehören neben dem Hämoprotein noch Phospholipide und das Flavoprotein Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-CYP-Reduktase. Initial erfolgt die Bindung eines Substratmoleküls, wodurch das im Hämin zentral gebundene  $\text{Fe}^{3+}$  in einen energetisch höheren Zustand versetzt wird. Im zweiten Schritt wird mittels der NADPH-CYP-Reduktase ein Elektron auf das Eisen übertragen und dieses zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert. Nun kann molekularer Sauerstoff als  $[\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2]$ -Komplex gebunden werden. Es schließt sich die Übertragung eines weiteren Elektrons entweder durch das aktivierte lösliche Cytochrom b5 oder erneut durch die NADPH-CYP-Reduktase an.

Der  $[\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2^-]$ -Komplex ist hochreaktiv und bewirkt die Substratoxidation. Der Reaktionsablauf ist mit folgender Summenformel vereinfacht dargestellt.



(R-H: Substrat, R-OH: hydroxylierter Metabolit)

## 2.3 CYP-Induktion

Da Organismen den ständig wechselnden Lebensbedingungen ihrer Umwelt ausgesetzt sind, ist die Fähigkeit zur Stoffwechsellanpassung von besonderer Bedeutung. Als ein wichtiger Regulationsmechanismus gilt die Enzyminduktion. Unter diesem Begriff ist eine durch Genaktivierung hervorgerufene Synthesesteigerung metabolisierender Enzyme zu verstehen. Endogene und exogene Substanzen lösen dabei eine vermehrte Bildung bestimmter Enzyme aus, die wiederum den Metabolismus der auslösenden Substanz oder anderer Stoffe beschleunigen. Neben erhöhten Transkriptionsraten ist die Stabilisierung und Akkumulation der spezifischen CYP-Boten-Ribonukleinsäure (-mRNA) oder des Enzyms selbst von Bedeutung.

Eine Enzyminduktion ist sowohl unter klinisch-pharmakologischen als auch toxikologischen Gesichtspunkten von Bedeutung. Ausgelöst durch Medikamente oder andere Fremdstoffe kann sie zu Arzneimittelwechselwirkungen, pharmakokinetischer Toleranz, Proliferation des endoplasmatischen Retikulums mit zunehmender Lebervergrößerung und zur Ausbildung von Tumoren führen. Aufgrund dieser vielfältigen Auswirkungen auf den Organismus besteht großes Interesse, CYP-induzierende Eigenschaften von Substanzen zu erkennen (Lin 2006).

Bisher wurde eine Vielzahl von Induktoren zusammengetragen und bezüglich ihrer Zuordnung zu CYP-Familien in Gruppen zusammengefasst. Zum Nachweis der jeweiligen Enzyminduktion gibt es verschiedene Möglichkeiten. Die am längsten praktizierte Methode ist der Induktionsnachweis auf Enzymaktivitäts-Ebene. Es wird der Umsatz eines für das zu untersuchende CYP spezifischen Substrats gemessen und auf die Menge des vorhandenen Enzyms geschlossen. Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht über Induktoren und Modellreaktionen der für diese Arbeit relevanten CYP-Familien 2B und 3A (Auswahl). Zum Nachweis der CYP2B1/2-Aktivität kann z.B. die 7-Pentoxyresorufin-O-Depentylierung (PROD) angewandt werden (Pohl und Fouts 1980). Die Testosteronhydroxylierung (TH) führt zu verschiedenen Metaboliten. Die  $16\beta$ -TH gilt als spezifisch für CYP2B, die  $2\beta$ -TH ist eine

spezifische Reaktion für die CYP3A1-Aktivität (Parkinson 1996). Alle drei Modellreaktionen wurden in vorliegender Arbeit genutzt.

**Tabelle 2.1** Induktoren und Modellreaktionen für CYP2B- und 3A-Isoenzyme (nach Parkinson 1996)

repräsentative Induktoren	CYP-Isoenzyme	enzymatische Modellreaktionen
Phenobarbital Antihistaminika Antioxidantien DDT <sup>1</sup> nicht planare PCBs <sup>2</sup>	CYP2B1, CYP2B2	16 $\beta$ -Testosteronhydroxylierung 7-Pentoxyresorufin-O-Dealkylierung 7-Benzyloxyresorufin-O-Dealkylierung
Pregnenolon-16 $\alpha$ -carbonitril Dexamethason Troleandomycin Clotrimazol Phenobarbital	CYP3A1, CYP3A2	2 $\beta$ -, 6 $\beta$ -, 15 $\beta$ -Testosteronhydroxylierung Erythromycin-N-Demethylierung

<sup>1</sup>Dichlordiphenyltrichlorethan, <sup>2</sup> Polychlorierte Biphenyle

Die Immunhistochemie stellt eine weitere Möglichkeit dar, die Expression verschiedener CYP-Isoformen nachzuweisen. Mittels spezifischer Antikörper kann neben den CYP-Expressionsmustern auch die Lokalisation der Enzyme sichtbar gemacht werden. Dies ist auch an Rattenleberschnitten möglich (Lupp et al. 2001).

Der Induktionsnachweis kann außerdem auf mRNA-Ebene sehr sensitiv und spezifisch erfolgen. Eine Quantifizierung gelingt mittels kompetitiver reverser Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Müller et al. (2000) konnten so eine CYP2B1-mRNA-Induktion durch Phenobarbital (PB) *in vitro* an Rattenleberschnitten nachweisen. Diese Methode wurde in vorliegender Arbeit ebenfalls angewandt.

## 2.4 CYP2B-Induktion

Beim Menschen sind Enzyme der CYP2B-Subfamilie an der Biotransformation verschiedener Antipsychotika und Antiepileptika beteiligt (Ronis und Ingelman-Sundberg 1998), tragen zum Metabolismus von Ecstasy bei (Meyer et al. 2008) und bewirken die Aktivierung von Arzneimitteln und Prokanzerogenen (Shu und Hollenberg 1997, Code et al. 1997, Bae et al. 2008). Es ist seit vielen Jahren bekannt, dass PB die Eigenschaft besitzt, Enzyme des Fremdstoff- und Steroidmetabolismus im Lebergewebe zu induzieren (Conney 1967, Kemper 1998). PB und PB-artige Induktoren sind in der Lage, die Expression einzelner Isoformen der CYP2A-, CYP2B-, CYP2C- und CYP3A-Subfamilien in verschiedenen Labortieren und im Menschen zu steigern. Die *CYP2B1/2*-Isoformen werden dabei besonders

stark induziert, wobei eine Neusynthese der Enzyme und der mRNA stattfindet (Adesnik et al. 1981, Waxman und Azaroff 1992). Daher gilt PB als CYP2B-Modellinduktor.

Der Mechanismus einer CYP2B-Induktion durch PB ist sehr komplex. Versuche, einen Barbituratrezeptor zu identifizieren, gelangen bisher nicht. Vielversprechender erscheinen Studien, die sich mit regulierenden DNA-Sequenzen PB-induzierbarer Gene und mit entsprechenden Bindungsproteinen befassen (Czekaj 2000). 1995 wurde erstmals ein Element innerhalb der CYP2B-Gene entdeckt, welches eine wichtige Rolle bei der PB-vermittelten CYP2B-Induktion spielt (Kemper 1998). Waxman (1999) berichtete von einem „PB-Responsive-Enhancer“ (PBRE) und stellte fest, dass diese Gensequenz eine zentrale Bindungsstelle für einen nukleären Faktor aufweist und auf beiden Seiten von Bindungsstellen für nukleäre Rezeptoren (NR1/NR2) flankiert ist. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass der nukleäre Rezeptor „Constitutive Androstane Receptor“ (CAR) die Induktion der CYP2B-Gene durch PB und PB-artige Induktoren vermittelt (Honkakoski et al. 1998). Der im Cytosol lokalisierte Rezeptor CAR transloziert in den Zellkern und bildet mit dem „Retinoid-X-Receptor“ (RXR) ein Heterodimer. Dort kommt es zur Interaktion zwischen Heterodimer und PBRE und Auslösung der CYP2B-Transkription (Waxman 1999, Czekaj 2000, Sueyoshi und Negishi 2001). Vermutlich führen neben PB auch Coregulatoren zu einer Aktivierung von CAR im Nukleus. Eine wichtige Rolle spielt der „Steroid Co-Activator 1“ (SRC-1), der die CAR-vermittelte Aktivierung der CYP2B1-Genexpression steigert (Edwards 1999, Muangmoonchai et al. 2001). Außerdem wurde ein Transkriptionsfaktor Sp1 identifiziert, welcher die basale Transkription und die Fremdstoff-induzierte Expression innerhalb der PB-abhängigen Gensequenzen erhöht (Muangmoonchai et al. 2001). Auch endogene Liganden, z.B. Androstanol und Androstenol, scheinen mit CAR zu interagieren und inhibieren dessen transkriptionelle Aktivität (Forman et al. 1998). Treten PB bzw. PB-artige Induktoren hinzu, wird die Bindung der inhibierenden Androstane aufgehoben (Waxman 1999). Zusätzlich scheint der Phosphorylierungsgrad regulierend auf die PB-Induktion zu wirken (Kemper 1998, Waxman 1999, Czekaj 2000, Sueyoshi und Negishi 2001). Bis heute bleibt allerdings offen, welche Mechanismen hinter der Aktivierung von CAR durch Xenobiotika stehen (Yamada et al. 2006).

Die Expression der CYP2B-Subfamilie scheint nicht nur durch CAR allein, sondern auch durch Wechselwirkungen mit anderen Faktoren wie dem „Pregnane-X-Receptor“ (PXR) gesteuert zu werden. CAR und PXR besitzen ein Spektrum gemeinsamer Liganden und Aktivatoren und können an gleiche DNA-Abschnitte der jeweiligen CYP-Gene binden

(Honkakoski und Negishi 2000, Handschin und Meyer 2003), wobei die Aktivierung der PXR-Reporter-Gensequenzen stärker mit einer CYP3A-Induktion korreliert ist, als mit der von CYP2B-Enzymen (Cui et al. 2005a). Bei PXR handelt es sich um einen konstitutiv inaktiven Rezeptor, der unabhängig von der Anwesenheit von Liganden ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist und durch die direkte Bindung eines Induktors aktiviert wird (Sueyoshi und Negishi 2001). Auch hier folgt, wie bei CAR, eine Heterodimerisierung mit einem RXR und damit die Transkription entsprechender Gene (Waxman 1999). Die vorzugsweise induzierte CYP3A-Subfamilie ist die in der Säugetier-Leber am meisten exprimierte CYP-Form. Sie ist an der Metabolisierung vieler Fremdstoffe inklusive Pharmaka und am Steroid- und Gallensäurestoffwechsel beteiligt. Vereinzelt werden Prokarzinogene wie Benzo[a]pyren und Aflatoxin B1 aktiviert. Die Gene der CYP3A-Subfamilie werden durch Glucocorticoide wie Dexamethason (DEXA), Makrolidantibiotika, Imidazole und PB induziert (Parkinson 1996, Gokhale et al. 1997). Für den Fremdstoffmetabolismus in der menschlichen Leber ist das Isoenzym CYP3A4 von besonderer Bedeutung, wobei die Gesamtmenge individuell stark schwankt (Forth et al. 2005). Aufgrund der genannten Wechselwirkungen könnte sich der CYP3A-Expressionszustand auf die Induzierbarkeit der CYP2B-Subfamilie auswirken.

## **2.5 Untersuchungsmodelle zum Nachweis einer CYP-Induktion**

### **2.5.1 In-vivo-Modell**

Um die potentiell induzierenden Eigenschaften von Xenobiotika aufzudecken, werden oft Ex-vivo-Verfahren durchgeführt. Dabei erfolgte die Fremdstoffapplikation am lebenden Tier, also in vivo, gefolgt von der Entnahme und Aufarbeitung des Zielorganes in vitro (Parkinson 1996). Die Leber eines Versuchstieres entspricht demzufolge einer Probe. Somit kann in vivo immer nur eine Substanz/Tier untersucht werden, was wiederum bei Testung mehrerer Substanzen die Anzahl benötigter Versuchstiere erhöht. Außerdem kann die Vorbehandlung mit Leiden der Tiere verbunden sein. Aus diesem Grund spielt die Verwendung geeigneter In-vitro-Modelle eine immer größere Rolle, zumal damit die Möglichkeit gegeben ist, auch menschliche Gewebeproben in vitro nutzen zu können und damit Speziesunterschiede auszuschalten.

## 2.5.2 In-vitro-Modelle

Zum Studium einer Enzyminduktion sind Systeme mit intaktem Transkriptions- und Proteinsyntheseapparat notwendig, z.B. isoliert perfundierte Lebern, isolierte Hepatozyten in Suspension oder Kultur und Leberschnitte. Die Nutzung von Gewebshomogenat, subzellulären Fraktionen und isolierten Enzymen, kann nur dazu dienen, eine bereits stattgefundene Induktion zu verifizieren. Die Auswahl wird hauptsächlich durch die Fragestellung bestimmt (Wrighton et al. 1995, Brandon et al. 2003, Farkas und Tannenbaum 2005, Pelkonen et al. 2005). Jedes In-vitro-Modell hat gewisse Vor- und Nachteile, auf die im Folgenden kurz eingegangen wird.

### 2.5.2.1 Isolierte Hepatozyten

Primäre Hepatozyten haben sich als gut standardisiertes in vitro-Modell zur Durchführung von Metabolismusstudien etabliert. Sie können in Suspension vorliegen, wobei die Lebensfähigkeit der Zellen auf wenige Stunden beschränkt ist. Werden sie auf einer speziellen extrazellulären Matrix kultiviert, so können sie bis zu 4 Wochen zu Induktionsstudien verwendet werden (Parkinson 1996). Von Vorteil ist die Möglichkeit, eine große Anzahl von Substanzen unter standardisierten Bedingungen zu testen (Worboys und Carlile 2001). Die Ergebnisse der CYP-Induktion durch Modellsubstanzen in kultivierten Hepatozyten in vitro korrelieren gut mit der Situation in vivo (Gebhardt et al. 2003).

Von Nachteil ist der Verlust der natürlichen Zellzusammensetzung des Gewebes. So fehlen z.B. Kupffer- und Endothelzellen, die für die Integrität und Funktionalität des Zellverbandes von Bedeutung sind. Weiterhin ist der Prozess der Isolation und Kultivierung der Zellen aufwendig und zeitintensiv. Frisch präparierte Hepatozyten benötigen mindestens 48-72 Stunden zur Regeneration und Adaptation an vorgegebene Kulturbedingungen, so dass Induktionsstudien erst nach 2-4 Tagen durchgeführt werden können. Zur Hepatozytenisolation werden außerdem proteolytische Enzyme eingesetzt, die zu Zerstörung und Entdifferenzierung der Zellen führen können (Ekins 1996, de Kanter et al. 2002, Farkas und Tannenbaum 2005). Der Verlust von Zell-Zell-Kontakten, der schon während der Zellisolation zur beginnenden Entdifferenzierung führt (Padgham und Paine 1993, Paine und Andreakos 2004, Elaut et al. 2006) ist gefolgt von massiven Veränderungen im Genexpressionsmuster mit deutlichen Abweichungen von den Verhältnissen in vivo (Boess et al. 2003, Perkins et al. 2006, Beigel et al. 2008).

### **2.5.2.2 Präzisionsleberschnitte**

Otto Warburg legte 1923 den Grundstein in der Entwicklung des Präzisionsleberschnittes als In-vitro-Modell zum Studium der Leberfunktionen. Er stellte Leberschnitte manuell mit Rasierklingen her. Neben mangelhafter Reproduzierbarkeit führte die unter diesen Bedingungen erreichbare Schnittdicke zu einer Einschränkung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung im Schnittinneren (Warburg 1923). Erst mit der Entwicklung eines Gewebeschniders war eine schnelle Herstellung vieler dünner Schnitte konsistenter Dicke mit minimalem Gewebstrauma von einer Versuchsleber möglich (Smith et al. 1985). Im Vergleich zu isolierten Hepatozyten sind sie relativ einfach herzustellen und unmittelbar nach der Präparation nutzbar. Ein großer Vorteil ist der Erhalt der organotypischen zellulären Strukturen, der Polarität und der interzellulären Transportmechanismen. Morphologische und immunhistochemische Untersuchungen sind ebenfalls möglich (Lupp et al. 2001, Brandon et al. 2003). Die Lebensfähigkeit des Gewebes kann bis zu 5 Tage aufrechterhalten werden (Fisher et al. 1995, Lake et al. 1996).

Damit sind Präzisionsleberschnitte ein effizientes In-vitro-Modell zum Studium der Bio-transformation und der Hepatotoxizität und wurden vielfach erfolgreich zum Studium der CYP-Induzierbarkeit eingesetzt (Gandolfi et al. 1996, Gebhardt et al. 2003). Auch im Jenner Institut für Pharmakologie und Toxikologie wurde die In-vitro-Induzierbarkeit mit verschiedenen Modellinduktoren an frischen und kryokonservierten Leberschnitten unbehauelter Ratten nachgewiesen (Müller et al. 1998, 2000, Glöckner et al. 2002, 2003, 2008, Lupp et al. 2001, 2002, 2008, Gebhardt et al. 2003). In vorliegender Arbeit wurden Rattenleberschnitte verwendet, die über 24 und 48 Stunden inkubiert wurden.

## **2.6 CYP2B-Induktion in Präzisionsleberschnitten**

Mit Präzisionsleberschnitten unbehauelter männlicher Ratten ist wiederholt eine CYP2B-Induzierbarkeit in vitro mit dem Modellinduktor PB gezeigt worden. Dabei wurden unter unterschiedlichen Bedingungen 4-20-fache Aktivitätssteigerungen beschrieben (Lake et al. 1993, 1996, Müller et al. 2000, Catania et al. 2007, Lupp et al. 2008). Dies entspricht Erfahrungen mit PB in vivo (Müller 1990, Mentzel und Patzer 1990). Auch auf mRNA-Ebene war eine CYP2B-In-vitro-Induktion nachweisbar, deren Ausmaße aber mit Faktoren zwischen 5 und 600 viel stärker schwankte (Müller et al. 2000, Glöckner et al. 2002, Pan et al. 2002, Meredith et al. 2003, Martignoni et al. 2004). Da das Ziel von Induktionsstudien letztendlich darin besteht, Erkenntnisse für den Menschen zu erhalten, ist die Verwendung

von Humangewebe anzustreben. Manche Arbeitsgruppen setzten zwar PB als Modellinduktor in Humanleberschnitten ein, untersuchten aber nicht den Effekt auf CYP2B, sondern auf CYP3A (Bedi-Singh et al. 2003, Persson et al. 2006). Andere Arbeitsgruppen untersuchten die CYP2B-Induktion in Humanleberschnitten, wobei unterschiedliche PB Konzentrationen (50, 500 und 2000  $\mu\text{M}$ ) und Expositionszeiten (5-72 Stunden) zur Anwendung kamen (Edwards et al. 2003, Martin et al. 2003, Olinga et al. 2008). Bei allen Autoren waren große interindividuelle Schwankungen der basalen Expression und Induzierbarkeit zu verzeichnen (mRNA-, Apoprotein-, Aktivitätsebene). Obwohl PB zu meist eine Steigerung auslöste (für die Einzelwerte 2- bis 17fach), wurde insgesamt keine signifikante Induktion erreicht. Stattdessen wurde die Frage aufgeworfen, welche Faktoren die Induzierbarkeit in vitro beeinträchtigen könnten und welche Rolle der genaue patientenbezogene Hintergrund (Arzneimittel, genetisches Profil) spielt. Umwelteinflüsse, Ernährung und Krankheiten mit pathologisch verändertem Gewebe mögen ebenfalls zu unterschiedlichen CYP-Expressionsmustern führen. Es stellte sich die Frage, ob durch geeignete Auswahlkriterien für Humangewebe geringere Schwankungen und eine bessere Nachweisbarkeit einer Induktion in vitro erreichbar sind.

Um einige dieser Fragen zu beantworten, könnte der Einfluss von Arzneimitteln, die in der Klinik häufig eingesetzt werden oder von denen eine Interaktion mit CYP2B-abhängigen Prozessen angenommen wird, systematisch in vitro untersucht werden. Für solche Grundlagenstudien sind zunächst Rattenleberschnitte geeigneter als Humanleberschnitte, da menschliches Gewebe nur begrenzt zu Versuchszwecken zur Verfügung steht und nicht standardisierbar ist.

Es ist bekannt, dass bei niedriger basaler CYP-Expression eine Induktion besser erkennbar ist als bei vorbestehender starker Expression (Bjornsson et al. 2003). Deshalb wurde mit Rattenleberschnitten untersucht, ob eine Induktion in vitro auch dann möglich ist, wenn das Lebergewebe vorher in vivo dem gleichen Modellinduktor ausgesetzt war. Hier gibt es offenbar Unterschiede zwischen verschiedenen Induktionstypen. Für den Induktor BNF ergab sich, dass der In-vivo-Effekt in vitro schnell wieder abklang und die CYP1A1-Induktion in vitro relativ unabhängig vom Ausgangsniveau erneut ausgelöst werden konnte (Glöckner et al. 2001, 2008). Nach In-vivo-Induktion mit DEXA klang die CYP3A-Induktion innerhalb der 24stündigen Inkubation der Leberschnitte in vitro nicht vollständig ab. Trotzdem war es möglich, eine erneute In-vitro-Induktion mit DEXA auszulösen (Lieder 2007). Im Gegensatz dazu führte eine Vorbehandlung mit PB in vivo zu einer star-



ken CYP2B-Induktion, die *in vitro* auf Enzymaktivitätsebene nur sehr langsam abnahm. Eine erneute Induktion *in vitro* mit PB war auf Enzymaktivitätsebene sehr schwierig oder gar nicht sichtbar zu machen. Da der Induktionseffekt auf mRNA-Ebene schneller abklang, war eine erneute CYP2B-Induktion *in vitro* aber mit Hilfe der mRNA-Bestimmung sicher nachweisbar (Lerch 2008).

Neben dem Einfluss der Basalexpression eines CYP auf seine eigene Induzierbarkeit sind auch Auswirkungen auf andere CYP denkbar, da es Interaktionen zwischen verschiedenen CYP-Familien gibt, d.h. der Expressionszustand einer CYP-Familie könnte sich auch auf die Expression und Induzierbarkeit einer anderen CYP-Familie auswirken. Dies ist besonders bei Wechselwirkungen zwischen verschiedenen steuernden Faktoren wie CAR und PXR zu vermuten. So wurden *in vivo* durch einen einzigen Modellinduktor Verschiebungen im gesamten hepatischen CYP-Expressionsmuster ausgelöst, indem die vermehrte Expression einer CYP-Form zu Lasten anderer basal exprimierter Formen stattfand (Guengerich et al. 1982). Mit Hepatozytenkulturen wurde gezeigt, dass eine durch PB ausgelöste CYP2B-Induktion mit DEXA verstärkt werden kann, allerdings in Abhängigkeit von der DEXA-Konzentration (Kocarek et al. 1994, Sidhu und Omiecinski 1995, Ringel et al. 2002). Da DEXA sowohl als Arzneimittel als auch als Zusatz zu Kulturmedien *in vitro* häufig verwendet wird, sollte im Rahmen dieser Arbeit dessen Einfluss auf die CYP2B-Induzierbarkeit untersucht werden. Eine Kombination verschiedener Induktoren wurde in Leberschnitten kaum systematisch untersucht. Bisher liegen Befunde zur CYP1A1-Induktion *in vitro* unter Einfluss von DEXA vor (Reinhardt 2009). Dabei wurde die CYP1A1-Induktion nicht durch DEXA gestört, teilweise sogar verbessert. Die Schlussfolgerung war, dass DEXA-behandeltes Spendergewebe uneingeschränkt für Untersuchungen der CYP1A1-Induzierbarkeit verwendet werden kann. Ob dies auch für die CYP2B-Induzierbarkeit zutrifft, sollte nun geklärt werden. Dabei ging es nicht um Interaktionsmechanismen, sondern um die Frage der Verwendbarkeit von vorinduziertem Lebergewebe und die Auswirkung von Induktorkombinationen *in vitro* mit Beteiligung zweier CYP-Familien.

Da DEXA bzw. der CYP3A-Expressionszustand als Einflussgröße auf die CYP2B-Induzierbarkeit untersucht werden sollte, kamen Leberschnitte weiblicher Ratten zum Einsatz. Eine Geschlechtsabhängigkeit der CYP3A-Aktivität bei erwachsenen Ratten ist bekannt (Sonderfan et al. 1987), und in früheren Studien hatte sich gezeigt, dass eine Induktion *in vitro* besser erkennbar ist, wenn Leberschnitte weiblicher statt männlicher Ratten verwen-

---

det werden (Glöckner et al. 2003). Desweiteren sollten verschiedene DEXA-Konzentrationen geprüft werden, um den möglichen dualen DEXA-Einfluss, der mit Hepatozyten beobachtet wurde (Kocarek et al. 1994, Sidhu und Omiecinski 1995, Ringel et al. 2002), zu berücksichtigen und um die Interaktion mit schwachen und starken CYP3A-Induktoren zu simulieren. Bei allen Versuchen sollte die CYP2B-Induktion in Abhängigkeit von der PB-Konzentration untersucht werden mit Hauptaugenmerk auf eine Veränderung der CYP-Aktivität als klinisch relevanter Parameter, aber auch mit Blick auf die Induktion der CYP2B-mRNA.

### 3 Zielstellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Induktion des Enzyms CYP2B1 in vitro unter Nutzung des Modellinduktors PB. Da die Ergebnisse breit angelegter In-vitro-Studien oft auf den lebenden Organismus extrapoliert werden, ist es wichtig, zuverlässige In-vitro-Systeme zu entwickeln, die der In-vivo-Situation nahe kommen. Es wurde das In-vitro-Modell „Präzisionsleberschnitt“ genutzt. Bei der angestrebten Nutzung von humanem Gewebe ist nicht auszuschließen, dass schon eine CYP-Induktion in vivo vorliegt, die den vorgesehenen Induktionsnachweis in vitro aufgrund von Wechselwirkungen beeinträchtigen könnte. Das Hauptziel bestand darin, zu klären inwieweit eine CYP3A-Induktion, erzeugt mit dem Modellinduktor DEXA, die CYP2B1-Induktion in vitro beeinflusst. Es sollte überprüft werden, ob Wechselwirkungen zwischen beiden Modellinduktoren eine CYP2B1-Induktion in vitro maskieren können. Anhand einer Reihe von Induktionsversuchen an Leberschnitten 40 Tage alter weiblicher Ratten galt es folgende Fragen zu beantworten:

**1. Welche Auswirkungen besitzt eine In-vivo-CYP3A-Induktion der Rattenleber durch DEXA auf eine In-vitro-Induktion mit PB?**

Ziel in naher Zukunft ist es, menschliches Lebergewebe zur Arzneimitteltestung heranzuziehen. Da humanes Material meist im Rahmen von Operationen kranker Menschen anfällt, die mit Medikamenten behandelt wurden, gilt es im Vorfeld zu klären, welche Rolle Spendergewebseigenschaften spielen. In unserer Studie wurde im Tierversuch eine In-vivo-Induktion von CYP3A durch Vorbehandlung mit DEXA erzeugt. Die Leberschnitte dieser Tiere wurden dann mit PB über 24 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Induktionsausmaßes. Mit Hilfe dieser Versuchsanordnung sollte geprüft werden, inwieweit DEXA-vorinduziertes Gewebe geeignet ist, eine mögliche CYP2B-Induktion durch Fremdstoffe in vitro zu testen.

**2. Wie verhält sich die In-vitro-Induzierbarkeit des CYP2B1 bei gleichzeitiger Einwirkung eines CYP3A-Induktors?**

Es sollte geklärt werden, ob grundsätzlich durch Interaktionen zwischen beiden Modellinduktoren Leberschnitte so weit beeinflusst werden, dass eine CYP2B1-Induktion nicht mehr zweifelsfrei erkannt werden kann. Dazu wurden Leberschnitte unbehandelter Ratten gleichzeitig für 24 Stunden mit DEXA und PB in vitro inkubiert. DEXA wurde in einer

---

niedrigen Konzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  und in einer hohen Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Damit sollte geprüft werden, ob es Unterschiede zwischen schwachen und starken CYP3A-Induktoren gibt.

**3. Ändert sich der CYP2B-Induktionseffekt, wenn DEXA bereits vor PB in vitro gewirkt hat?**

In dieser Versuchserie wurden ebenfalls Leberschnitte von unbehandelten Ratten verwendet, die zunächst für 24 Stunden mit DEXA in den Konzentrationen von 0,01  $\mu\text{M}$  oder 1  $\mu\text{M}$  inkubiert wurden, um die Exposition mit PB über weitere 24 Stunden anzuschließen.

Mit Hilfe dieses Versuchsaufbaus sollte die In-vivo-Induktion von CYP3A in vitro simuliert werden. Von Interesse war der Vergleich der PB-abhängigen CYP2B1-Induktion nach erfolgter Applikation von DEXA in vivo und in vitro. Existieren mögliche Parallelen zwischen dem In-vitro-Versuch und der In-vivo-Studie? Inwieweit sind reine In-vitro-Versuche geeignet die Situation in vivo zu reflektieren?

Die Ergebnisse dieser Studie sollten dazu beitragen, das Modell Präzisionsleberschnitt zu standardisieren und für die Testung von potentiellen CYP-Induktoren zu etablieren. Es war nicht das Ziel der Arbeit, Mechanismen der Induktion und der möglichen Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Induktoren aufzuklären.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Versuchstiere

Für alle Versuchsreihen wurden die Lebern 40 Tage alter weiblicher Han-Wist-Ratten verwendet. Die Tiere gingen aus dem Auszuchtstamm (Han:WIST) des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena hervor. Die Haltung der Ratten erfolgte unter Standardbedingungen (Temperatur:  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 12/12h Hell-Dunkel-Zyklus, relative Luftfeuchte  $50 \pm 10\%$ ) in Plastikboxen. Die Würfe wurden auf 6 Jungtiere begrenzt, die bis zum 30. Tag beim Muttertier blieben. Nach anschließender Geschlechtertrennung wurden die Tiere zu dritt in Gruppen gehalten. Die Fütterung bestand aus der Gabe von Altromin-1316-Pellets und Leitungswasser ad libitum.

Zur Durchführung der reinen In-vitro-Versuche wurden Leberschnitte unbehandelter Ratten verwendet. Die geplanten In-vivo-Versuche wurden an Leberschnitten DEXA-vorbehandelter Tiere durchgeführt.

Um eine CYP3A-Induktion in vivo zu erreichen, wurde den Tieren 1 x täglich an drei aufeinander folgenden Tagen DEXA in der sicher induzierenden Dosis von 4 mg/kg Körpermasse (KM) intraperitoneal injiziert (Reuter und Köhler 1991). Dazu wurde das Dexamethasonpräparat (Fortecortin Mono 4<sup>®</sup>, Merck) mit 0,9%iger NaCl-Lösung 1:10 verdünnt und je 1 ml/100 g Körpermasse gespritzt. Die Injektion an sich und 0,9%ige NaCl-Lösung beeinflussen die Biotransformation nicht (Meißner 1995). Die Gewinnung des Lebergewebes erfolgte 24 Stunden nach der letzten DEXA-Gabe.

### 4.2 Präparation der Leberschnitte

Nach Dekapitation in leichter Äthernarkose und kurzem Ausbluten wurden die Tiere durch einen Bauchschnitt geöffnet und die Lebern unter Kontaktvermeidung zum Magen-Darminhalt heraus präpariert. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Lebern in frischem Krebs-Henseleit-Puffer (KH-Puffer) bei Raumtemperatur zweimal gespült und aufbewahrt.

**Tabelle 4.1** Zusammensetzung des Krebs-Henseleit (KH)-Puffers (Gebrauchslösung)

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
NaCl	120,0 mM
KCl	4,8 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,2 mM
CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1,25 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25,0 mM
<b>Zusatz</b>	
Hepes	300 mg/100 ml
Gentamicinsulfat	5 mg/100 ml
Ampicillin-Natrium	1 mg/100 ml

Von jeder Leber wurden zunächst 2 Stücke gewonnen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Darin wurde später die Ausgangslage des Gewebes bezüglich schon vorhandener CYP-Aktivität bestimmt. Die anschließend aus den Leberlappen ausgestanzten Gewebezylinder mit einem Durchmesser von 8 mm (Müller et al. 1998) wurden im mit KH-Puffer gefüllten Krumdieck-Schneider (Alabama R&D Corp., Munford, AL, USA) zu Präzisionsleberschnitten verarbeitet. Die Schnittdicke betrug stets 200-250 $\mu\text{m}$ . Abschließend wurden die Schnitte portionsweise entnommen und in vorbereitete Inkubationskölbchen überführt.

### 4.3 Inkubation der Leberschnitte

Die Schnittinkubation erfolgte in Erlenmeyer-Kölbchen, die folgendermaßen bestückt wurden: maximal 4 Schnitte in 25-ml-Kölbchen mit je 5 ml Kulturmedium oder maximal 8 Schnitte in 50-ml-Kölbchen mit je 10 ml Kulturmedium. Als Kulturmedium wurde William's Medium E (Biochrom<sup>®</sup>) mit Zusatz von Glutamin (29,2 mg/100 ml), Insulin human (Actrapid<sup>®</sup>, 345  $\mu\text{l}$ /100 ml), Tylosintartrat (10,0 mg/100 ml), Gentamicinsulfat (5,0 mg/100 ml) und Ampicillin-Natrium (1,0 mg/100 ml) verwendet. Anschließend wurde jedes Kölbchen unter Carbogenbegasung (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>; 10-15 l/h) bei 37°C im Wasserbad bidirektional (~105 r.p.m.) bewegt.

Die Versuchsserien wurden über 24 und 48 Stunden durchgeführt. In allen Versuchsreihen erfolgte nach zweistündiger Inkubation der erste Medienwechsel. Die Inkubation über einen Zeitraum von 48 Stunden erforderte nach 24 Stunden einen erneuten Medienwechsel und die Entnahme einiger Schnitte zur Aktivitätsbestimmung vor der PB-Zugabe.

Die verschiedenen Versuchsserien und Inkubationsgruppen sind der Tabelle 4.2 zu entnehmen.

**Tabelle 4.2** Versuchsanordnung

1. Versuchsserien	Induktorexposition			Induktorkonzentration	
	in-vivo	in-vitro 0-24h	in-vitro 24-48h	DEXA [ $\mu$ M]	PB [ $\mu$ M]
2. Vorversuche		PB			5, 10, 50, 100
3. In-vivo-Versuche	DEXA	PB			5, 10, 50, 100
4. Simultanversuche		DEXA+PB		0,01; 1	5, 10, 50, 100
5. Sukzessivversuche		DEXA	PB	0,01; 1	5, 10, 50, 100

DEXA wurde in wasserlöslicher Form aus Ampullen (Fortecortin Mono 4<sup>®</sup>, Merck) entnommen und vor dem Zusatz zum Medium mit aqua dest vorverdünnt. Der Induktor PB wurde als Natriumsalz in aqua dest gelöst und entsprechend verdünnt.

Nach abgelaufener Inkubation wurden die Leberschnitte rasch entnommen und mit Filterpapier abgetupft. Die Schnittmassenbestimmung erfolgte an einer Analysenwaage (Mechatronik sartorius MC 1).

Anschließend wurden die Schnitte portioniert für die später durchzuführenden Nachweisreaktionen (PROD, TH) und die RT-PCR in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren und vorübergehend bei -80°C gelagert.

#### 4.4 Induktionsnachweis auf Enzymaktivitätsebene

Zum Nachweis der Induktion auf Enzymaktivitätsebene wurden die beiden Modellreaktion PROD und TH durchgeführt. Für beide Verfahren und für die Proteinbestimmung wurde Schnitthomogenat eingesetzt. Dazu wurde aus jeweils 5 Leberschnitten durch Zusatz von 0,1 M Na-Phosphat-Puffer, pH 7,44 eine 1:30-Verdünnung hergestellt und mittels Ultraschall homogenisiert. Während des Homogenisierens befand sich das Gefäß mit den Leberschnitten zur Kühlung im Eisbad.

Die mittels PROD und TH bestimmten Enzymaktivitäten wurden in  $\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$  angegeben.

#### 4.4.1 7-Pentoxoresorufin-O-Depentylierung (PROD)

Es handelt sich um eine Modellreaktion zum Nachweis der PB-induzierbaren Aktivität des Enzyms CYP2B (Lubet et al. 1985, Lubet et al. 1990, Müller 1990). Die Durchführung der PROD erfolgte in Anlehnung an (Pohl und Fouts 1980). Das bei der Reaktion pro Zeiteinheit entstehende Resorufin gilt als Maß für den Umsatz und ist bereits in kleinen Mengen nachweisbar.

In Reagenzröhrchen für Haupt- und Leerwerte wurden zu Beginn 0,1 ml in Methanol gelöstes Pentoxoresorufin (Substrat) vorgelegt. Das Verdampfen des Lösemittels erfolgte unter einem Abzug im Wasserbad. Anschließend wurden folgende Reagenzien pipettiert:

Na-Phosphat-Puffer (0,1 M) pH 7,44	0,1 ml
MgCl <sub>2</sub> (10 µmol/0,1 ml)	0,1 ml
G-6-P-Na <sub>2</sub> (2,5 µmol/0,1 ml)	0,1 ml
Homogenat (1:30)	0,1 ml

Damit ergab sich bei einem Reaktionsvolumen von 0,5 ml eine Substratkonzentration von 10 µM. Nach Mischen wurden die Proben im Wasserbad bei 37°C für circa 2 min temperiert. Der Reaktionsstart erfolgte mit 0,1 ml NADPH (0,25 µmol/0,1 ml). Die Inkubationszeit belief sich auf 10 min. Mit einer Zugabe von 1 ml reinem eisgekühlten Methanol wurde die Reaktion gestoppt und die Proben rasch auf Eis gestellt. Die mitgeführten Leerwerte enthielten alle Reagenzien der Hauptwerte, jedoch erfolgte die Zugabe von Methanol vor derjenigen von NADPH.

Vor Beginn der Messung wurden alle Proben, für 10 min zentrifugiert. Die fluorimetrische Bestimmung erfolgte am Photometer (HITACHI) bei 540 nm Exzitations- und 585 nm Emissionswellenlänge.

Für jeden Versuchsansatz wurde eine Eichkurve mit definierten Konzentrationen an Resorufin mitgeführt.

#### 4.4.2 Testosteronhydroxylierung (TH)

Aufgrund der chemischen Struktur des Testosterons kann an verschiedenen Positionen eine  $\alpha$ - oder  $\beta$ -ständige Hydroxylierung erfolgen. Anhand des Metabolitenmusters können Rückschlüsse auf das in den Leberschnitten induzierte CYP-System getroffen werden.



Die Reaktion wurde - wie bei Glöckner et al. (2003) beschrieben - mit geringfügigen Änderungen als Doppelbestimmung durchgeführt.

In die Hauptwerte wurde Folgendes pipettiert:

Na-Phosphat-Puffer (0,1 M) pH 7,44	0,2 ml
MgCl <sub>2</sub> (10 µmol/0,1 ml)	0,2 ml
G-6-P (2,5 µmol/0,1 ml)	0,2 ml
Homogenat (1:30)	0,2 ml
Substrat (Testosteron 50 mM in Methanol)	10 µl

Der Leerwert enthielt alle Reagenzien der Hauptwerte und anstelle des Homogenats 0,2 ml Na-Phosphat-Puffer (0,1 M). Die Proben wurden gut geschüttelt und anschließend für 2 min bei 37°C im Wasserbad temperiert. Der Reaktionsstart erfolgte mit der Zugabe von 0,2 ml NADPH (0,25 µmol/0,1 ml). Während der Inkubationszeit von 10 min wurden die Proben im Wasserbad bewegt. Nach Reaktionsstopp mit 1,5 ml eisgekühlter Trichloressigsäure (TCA) wurden die Proben zunächst auf Eis gestellt und dann bei -20°C vorläufig gelagert.

Die Bestimmung der TH-Metabolite erfolgte mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Zur Isolation des Substrates und der Metabolite wurde im Vorfeld eine Festphasenextraktion durchgeführt. Dazu wurden die Proben nach Zugabe eines internen Standards (Corticosteron) über Extraktionssäulchen (Strata X Phenomenex<sup>®</sup>) gegeben und anschließend mit Methanol und Aqua bidest eluiert. Das Eluat wurde in Probenröhrchen aufgefangen und mit Stickstoff bei circa 50°C zur Trockne eingeengt.

Anschließend wurde jede Probe in 150 µl mobiler Phase, bestehend aus 65,7% Aqua bidest, 27,3% Methanol und 7% Tetrahydrofuran, gelöst und in Messvials umgefüllt. Die Durchführung der HPLC erfolgte an speziellen Säulen (kromasil 100, C18, 5 µm, 300 x 4,0 mm) bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die Metabolite wurden bei einer Wellenlänge von 254 nm bestimmt und in Form von Peaks computergestützt aufgezeichnet. Mit Hilfe einer Eichkurve konnten die Peaks den einzelnen Metaboliten zugeordnet werden. Die Berechnung erfolgte anhand ermittelter Flächenintegrale von Metaboliten und internem Standard.

Von den durch die TH entstehenden Metaboliten wurde die Auswertung auf die beiden, für diese Arbeit wichtigsten Produkte, 16 $\beta$ -OH-T und 2 $\beta$ -OH-T, begrenzt. 16 $\beta$ -OH-T ist relativ spezifisch für den Aktivitätsnachweis der CYP2B-Enzyme, während das 2 $\beta$ -OH-T die durch DEXA induzierbare CYP3A1-Aktivität anzeigt.

#### 4.4.3 Proteinbestimmung

Um den Proteingehalt der Leberschnitte als Bezugsgröße für die Biotransformationsaktivitäten zu bestimmen, wurde die modifizierte Biuret-Methode nach Klinger und Müller (1974) angewandt.

Proteine sind durch Peptidbindungen (-CO-NH-) gekennzeichnet, deren Anzahl proportional zur Peptidlänge ist. Die Biuret-Reaktion beruht darauf, dass zwei oder mehr Peptidbindungen mit Kupferionen im alkalischen Milieu rotviolette Komplexe bilden. Die Farbintensität ist proportional der Zahl der Peptidbindungen und damit zur quantitativen Proteinbestimmung geeignet.

Der Reaktionsansatz bestand aus Hauptwerten und dazugehörigen Trübungswerten. Um mögliche Trübungsfehler zu minimieren wurde jeweils für Haupt- und Trübungswerte ein entsprechender Leerwert mitgeführt.

Die Haupt- und Trübungswerte enthielten jeweils 150  $\mu$ l Homogenat. Die entsprechenden Leerwerte enthielten stattdessen Na-Phosphat-Puffer. Zu Anfang wurde in alle Proben 50  $\mu$ l 10%iges Na-Desoxycholat pipettiert, um die Proteinstruktur zu lockern. Nach Mischen und 5minütigem Warten erfolgte die Zugabe von 800  $\mu$ l Biuret-Lösung in die Hauptproben und deren Leerwert. In die Trübungswerte mit dem zugehörigen Trübungsleerwert wurden 800  $\mu$ l 3%ige NaOH-Lösung gegeben. Die Proben wurden erneut gut gemischt und nach einer 30minütigen Reaktionszeit photometrisch gemessen. Die Extinktionsbestimmung erfolgte am Spekol (Carl-Zeiss-Jena) bei einer Wellenlänge von 546 nm gegen die entsprechenden Leerwerte.

Der Proteingehalt konnte aus der Differenz der Extinktion von Mess- und Trübungswert ermittelt werden. Zur Berechnung wurde eine Eichkurve aus Rinderserumalbumin angefertigt.

## 4.5 Induktionsnachweis auf mRNA- Ebene

Die CYP2B1-Induktion durch PB kann auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Die durch Induktorgabe veränderte Genexpression führt zu einer Verschiebung der mRNA-Konzentration, die die genetische Information des CYP2B1 trägt. Zur Quantifizierung transkribierter mRNA wurde im Rahmen dieser Arbeit die Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt. Diese Methode ist sensitiv und spezifisch für die nachzuweisende mRNA, da diese anhand ihrer Sequenz erkannt und damit von anderen mRNA-Molekülen unterschieden wird. Außerdem gelingt es auf mRNA-Ebene, eine Induktion noch vor Enzymsynthese nachzuweisen bzw. eine mRNA-Abnahme bei noch gesteigerter Enzymaktivität zu verifizieren. Die für CYP2B1-mRNA eingesetzten spezifischen Primer hatten folgende Basensequenzen:

CYP2B1-forward-Primer: 5'-CCA AGC GCT CCA CGA GAC TT- 3'

CYP2B1-reverse-Primer: 5'-TTG GGA AGC AGG TAC CCT C- 3'

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus jeder Versuchsreihe Leberschnitte zweier Tiere zur mRNA-Bestimmung aus vorher festgelegten Gruppen verwendet. Die Auswahl der Tiere erfolgte stichprobenartig.

### 4.5.1 RNA-Isolierung

Die Extraktion der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Invisorb RNA Kit II durchgeführt. Die Bestimmung der RNA-Ausbeute und die Qualitätsprüfung der Proben erfolgten am UNICAM-Spektrometer. Die Präparation wurde in Anlehnung an das Herstellerprotokoll vorgenommen.

Im ersten Schritt wurden die zuvor bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Leberschnitte (Schnittmasse  $\leq 50$  mg pro Probe) mit 500  $\mu\text{l}$  Lysis-Solution versetzt und anschließend manuell homogenisiert. Mit Hilfe dieser Prozedur wurde das Gewebe mechanisch aufgeschlossen und eine gleichzeitige Denaturierung und Sedimentation von Biomembranen erreicht. Da die zytosolische Gewebefraktion neben RNA auch DNA enthält, wurde sie mit 30  $\mu\text{l}$  DNA-Absorber versetzt, der die DNA bindet und entfernt. Im zweiten Schritt erfolgte die Phenolextraktion zur Isolierung der RNA aus der löslichen Gewebefraktion. Durch Zugabe von Isopropanol präzipitierte die RNA und konnte mittels Zentrifugation abgetrennt wer-

den. Nach dreimaliger Waschung mit 70%-igem Ethanol und anschließender Trocknung wurden die Präzipitate in Nuklease-Free-Water (NFW) zur Lösung gebracht.

Am UNICAM-Spektrometer wurden die Absorptionsmaxima der RNA und der Proteine erfasst.

Eine maximale Absorption der Nukleinsäuren, bedingt durch ihre heterozyklischen Basen, liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Proteine absorbieren bei einer Wellenlänge von 280 nm maximal. Die Werte beider Absorptionsmaxima ins Verhältnis gesetzt, ergeben einen Quotienten  $Q = A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ , mit dem die Reinheit der Nukleinsäurelösungen überprüft werden kann. Dieser sollte zwischen 1,7 und 2 liegen. Die Konzentrationen der Gesamt-RNA in den Proben wurden aus den Werten der Absorption bei 260 nm errechnet.

#### 4.5.2 Reverse Transkription (RT)

Der Vorgang der Transkription beschreibt die Synthese der mRNA unter Vorlage einer DNA- Matrize. Mit Entdeckung des viralen Enzyms reverse Transkriptase (RT) wurde es umgekehrt möglich, mRNA in DNA umzuschreiben. Mit Hilfe von Oligo-(dT) Primern, die an die Polysequenz am 3' Ende der mRNA binden, kann die reverse Transkriptase unter Desoxy-Nukleosid-Triphosphat (dNTP)-Verbrauch eine DNA-Kopie synthetisieren. Zur Durchführung der RT wurde ein Mastermix folgender Zusammensetzung hergestellt:

NFW:	5,05 µl
10fach-Puffer:	1 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM):	2 µl
dNTP-Mix (10 mM):	1 µl
CYP2B-Rev-Primer (20 µM):	0,5 µl
RNAsin:	0,2 µl
AMV Reverse Transkriptase:	0,15 µl
Roh-RNA:	0,1 µl

Die RT erfolgte im Mastercycler mit einem Zyklus von 3 x 12 min bei Temperaturen von 42°C, 45°C und 48°C.

Im Anschluss wurde die entstandene DNA-Kopie mittels PCR amplifiziert (s.u.). Die RT-PCR-Produkte konnten bei -20°C gelagert werden.

### 4.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren zur enzymatischen Vermehrung von DNA-Abschnitten (Mullis 1986). Sie besteht prinzipiell aus drei Zyklen:

1. Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei Temperaturen von 94-95°C.
2. Primer-Annealing (Hybridisierung): zugegebene spezifische Oligonukleotide lagern sich den Matrizensträngen bei 55°C an.
3. Elongation: durch Zusatz einer Taq-DNA-Polymerase werden die Einzelstränge ausgehend von der Primerposition in Richtung 5'-3' komplementiert. Dieser Prozess läuft unter Desoxy-Nukleosid-Triphosphat-Verbrauch bei 72°C ab. Die benötigte Taq-DNA-Polymerase stammt von thermophilen Bakterien (*Thermus aquaticus*), die selbst bei 100°C aktiv bleiben.

Geschilderte Reaktionszyklen können mehrfach wiederholt werden. Damit lassen sich die Kopien der Zielsequenz exponentiell vervielfältigen.

Der Mastermix für eine Probe bestand aus:

NFW:	18,7 µl
10fach-Puffer inkl. 15mM MgCl <sub>2</sub> :	2,5 µl
dNTP-Mix (10mM):	0,5 µl
CYP2B-Fw-Primer (20µM):	1,0 µl
CYP2B-Rev-Primer (20µM):	1,0 µl
Taq-Polymerase (Eppendorf®)	0,3 µl
RT-Produkt	1,0 µl

Die PCR wurde im vorgeheizten Mastercycler mit insgesamt 36 Amplifikationszyklen durchgeführt. Um Kontamination auszuschließen wurden Negativkontrollen mitgeführt.

#### 4.5.4 Kompetitive RT-PCR

Das Prinzip der kompetitiven RT-PCR beruht darauf, dass die RT-PCR-Produkte der Roh-RNA-Proben mit denen verschiedener Eich-RNA-Verdünnungen verglichen werden. RT und PCR der Proben-RNA erfolgten unter Zusatz von Eich-RNA in bekannten Konzentrationen, deren Herstellung bei (Müller et al. 2000) beschrieben wurde. Da Roh- und Eich-RNA große Anteile identischer Sequenzen aufweisen und die PCR-Produkte lediglich relativ geringe Größenunterschiede besitzen, konkurrieren zugegebene Primer und Basen um vorhandene Bindungsplätze. Die produzierten Transkripte betragen für die CYP2B1-Proben-RNA 380 Basenpaare (bp) und für die CYP2B1-Eich-RNA 309 Basenpaare (bp). Der RT-Mastermix für eine Probe unterschied sich von dem unter 4.5.2. beschriebenen Ansatz lediglich dadurch, dass in jedem Reaktionsgefäß 1 µl NFW durch einen µl einer Eich-RNA-Verdünnung ersetzt wurde. Da jede Roh-RNA-Probe mit 8 verschiedenen Eich-RNA-Verdünnungen getestet werden sollte, wurde der Mastermix zunächst in 8facher Menge ohne Eich-RNA angesetzt und aliquotiert. Alle anderen Schritte der RT und PCR wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

#### 4.5.5 Gelelektrophorese

Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte mittels eines elektrophoretischen Trennverfahrens. Da die DNA-Moleküle negativ geladen sind, wandern sie bei konstant anliegender Spannung zur Anode (Nicholl 1995) und können so entsprechend ihrer Molekülgröße getrennt werden. Als Trägermaterial wurde 2%iges Agarosegel benutzt. Dazu wurde die Agarose mit 10fachem DNA-Elektrophorese-Puffer bestehend aus:

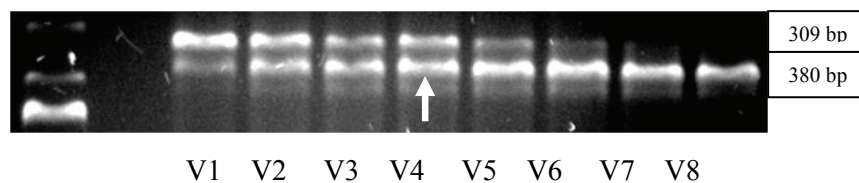
Tris [Tris(hydroxymethyl)aminomethan]	53,85 g
Borsäure	27,60 g
EDTA (2 mM)	3,72 g

versetzt und in der Mikrowelle zu einer homogenen Lösung aufgeköcht. Um die DNA-Moleküle sichtbar zu machen, wurde dem Gel Ethidiumbromid (0,5 µg/ ml) in einer Verdünnung 1:200 zugesetzt. Ethidiumbromidmoleküle lagern sich aufgrund ihrer planaren Struktur in RNA- bzw. DNA-Stränge ein und fluoreszieren aufgrund der Wechselwirkungen mit den Nukleinsäuren im ultravioletten Licht orange- bis rosafarben.

Die zu untersuchenden PCR-Produkte wurden mit einem Beladungspuffer (Blaumarker, 6  $\mu$ l/ Probe) angefärbt, der im Gel mit wandert, den Elektrophoreseverlauf kennzeichnet und das Pipettieren erleichtert. Außerdem wurde eine 50-bp-DNA-Leiter mitgeführt, welche eine Größenbestimmung der DNA-Fragmente ermöglicht. Die zurückgelegte Wegstrecke der Nukleinsäuren ist umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Basenpaarzahl.

#### 4.5.6 Auswertung

Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Gel im UV-Licht betrachtet. Die Nukleinsäuren stellten sich als fluoreszierende Banden dar. Bei der traditionellen RT-PCR war die Bandenstärke ein Hinweis auf die Konzentration der spezifischen CYP2B1-mRNA (semi-quantitative Bestimmung als Übersichts-RT-PCR). Bei der kompetitiven RT-PCR wurden die entstandenen PCR-Produkte der Proben-RNA mit denen der Eich-RNA verglichen und der Äquivalenzpunkt bestimmt (Abb. 4.1). Die Berechnung der Menge induzierter CYP2B1-Transkripte erfolgte anhand bekannter Konzentrationen der Eich-RNA-Verdünnungen. Die Elektropherogramme wurden mit einem Videodokumentationssystem aufgezeichnet und mittels bildverarbeitender Software am PC ausgewertet.



**Abb. 4.1** Gelelektrophorese nach kompetitiver RT-PCR; Banden der RT-PCR-Produkte aus CYP2B1-Proben-RNA (380 bp) und Eich-RNA (309 bp), V1-V8 entsprechen den Verdünnungsstufen der Eich-RNA, Markierung des Äquivalenzpunktes mittels des Pfeiles, bei welchem Proben-Eich-RNA-Produkte in gleichen Konzentrationen vorliegen

#### 4.6 Statistik

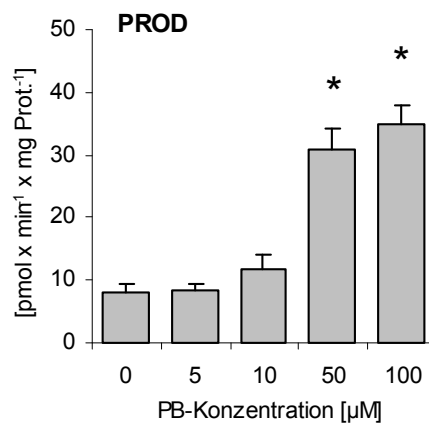
Die Ergebnisdarstellung erfolgte anhand von Diagrammen, die die errechneten arithmetischen Mittelwerte und Standardfehler von jeweils 5 bzw. 6 unabhängigen Schnittpräparationen (5 bzw. 6 Lebern) zeigen. Des Weiteren wurden die Gruppen einer Versuchsreihe untereinander verglichen und mit Hilfe des t-Testes nach Student für gepaarte Beobachtungen auf Signifikanz geprüft unter Zugrundelegung einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ .

## 5 Ergebnisse

### 5.1 CYP2B1-Induktion in vitro durch PB in Leberschnitten un- behandelter Ratten

In der ersten Versuchsserie erfolgte die 24stündige Inkubation von Leberschnitten un-  
behandelter weiblicher Ratten mit PB, um die Konzentrationsabhängigkeit der PB-  
Wirkung auf die CYP2B-abhängige PROD zu demonstrieren.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die PROD-Aktivität durch In-vitro-Einwirkung von  
PB konzentrationsabhängig steigern lässt (Abb. 5.1). Niedrige PB-Konzentrationen von 5  
 $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  verursachten keine Umsatzsteigerungen. Mit den beiden hohen PB-  
Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  ließen sich die Umsätze jedoch signifikant stei-  
gern. In der Gruppe mit der höchsten PB Konzentration wurde im Vergleich zu der Kont-  
rollgruppe ohne PB das 4fache an Umsätzen erreicht. Die Enzymaktivitäten waren mehr  
als doppelt so hoch wie in unbehandelter frischer Rattenleber vor der Schnittpräparation.  
Damit wurde die Ausgangsaktivität der Leber durch PB in vitro deutlich überschritten.



**Abb. 5.1** PROD-Aktivität in Leberschnitten un behandelter Ratten nach 24stündiger Inkubation mit  
PB in vitro; Darstellung arithmetischer Mittelwerte und Standardfehler,  $n = 6$ , signifikante Unter-  
schiede (gepaarter t-Test,  $p < 0,05$ ) zur Kontrollgruppe ohne Zusätze = \*; mittlere PROD-Aktivität  
der Lebern vor der Schnittpräparation:  $16 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$

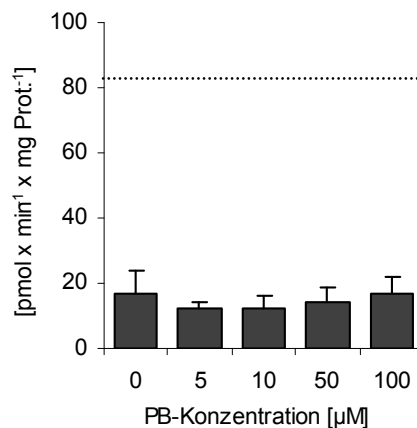


## 5.2 CYP2B1-Induktion in vitro durch PB in Leberschnitten DEXA-vorbehandelter Ratten

Dieser Versuchsansatz sollte zeigen, inwieweit die durch DEXA ausgelöste In-vivo-Induktion des CYP3A1 die CYP2B1-Induktion durch PB in vitro beeinflusst.

### 5.2.1 Kontrolle des DEXA-Effekts: 2 $\beta$ -TH

Die durch DEXA ausgelöste In-vivo-Induktion des CYP3A1 wurde durch eine hohe 2 $\beta$ -TH-Aktivität der Lebern vor der Schnittpräparation nachgewiesen. Sie betrug im Schnitt  $83 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$  und war damit circa 10fach höher als in Lebern unbehandelter Tiere, in denen im Mittel  $8 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$  gemessen wurden (n=17). In inkubierten Leberschnitten war der DEXA-Effekt in vitro innerhalb von 24 Stunden rasch abgeklungen (Abb. 5.2) und unterschied sich nicht mehr signifikant von der mittleren Aktivität unbehandelter Lebern. Auch nach Zugabe von PB in verschiedenen Konzentrationen blieb die 2 $\beta$ -TH in allen Gruppen niedrig.



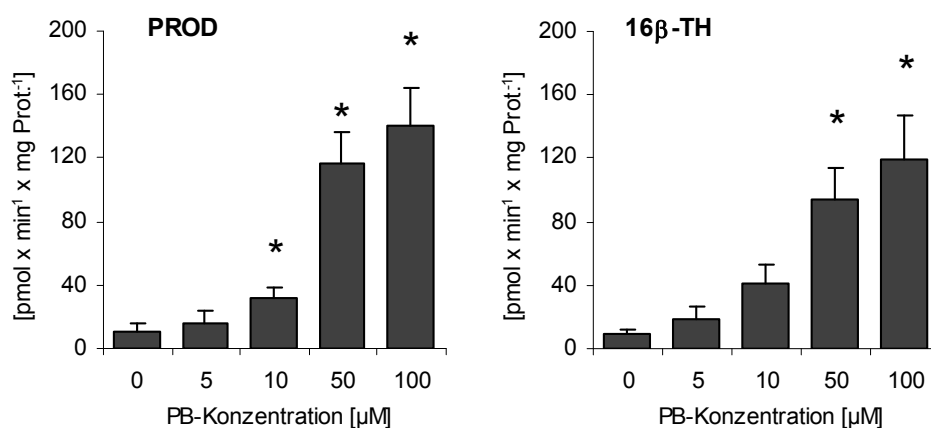
**Abb. 5.2** 2 $\beta$ -TH-Aktivität in Leberschnitten DEXA-vorbehandelter Ratten (3 x 4 mg/kg KM) nach 24stündiger Inkubation mit PB in vitro; horizontale Linie = mittlere 2 $\beta$ -TH-Aktivität in Lebergewebe vor der Schnittpräparation; Darstellung arithmetischer Mittelwerte und Standardfehler, n = 6

### 5.2.2 CYP2B1-Aktivität

Die In-vivo-Injektion von DEXA besaß keinen signifikanten Einfluss auf die PROD-Aktivität der Lebern vor Schnittpräparation und in inkubierten Leberschnitten ohne PB Exposition (Abb. 5.3). Nach Zugabe von PB in vitro in verschiedenen Konzentrationen konnten höhere absolute PROD-Aktivitäten nachgewiesen werden als in Leberschnitten unbehandelter Tiere (Vgl. Abb. 5.1 mit Abb. 5.3). DEXA schien somit die konzentrationsabhängige Induktion der PROD durch PB nicht zu stören, sondern eher zu verstärken.

Auch die Ergebnisse der zweiten Nachweisreaktion, 16 $\beta$ -TH, zeigten, dass mit zunehmenden PB-Konzentrationen die Induzierbarkeit der CYP2B1-abhängigen Biotransformation ansteigt (Abb. 5.3).

Signifikant erhöhte Enzymaktivitäten, bezogen auf die Kontrollgruppe ohne Zusätze, wurden mit beiden Nachweisreaktionen in allen Leberschnittproben, denen 50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M PB zugesetzt wurde, gemessen. Nach 100  $\mu$ M PB betrug der mittlere Induktionsfaktor für die beiden Reaktionen 13.



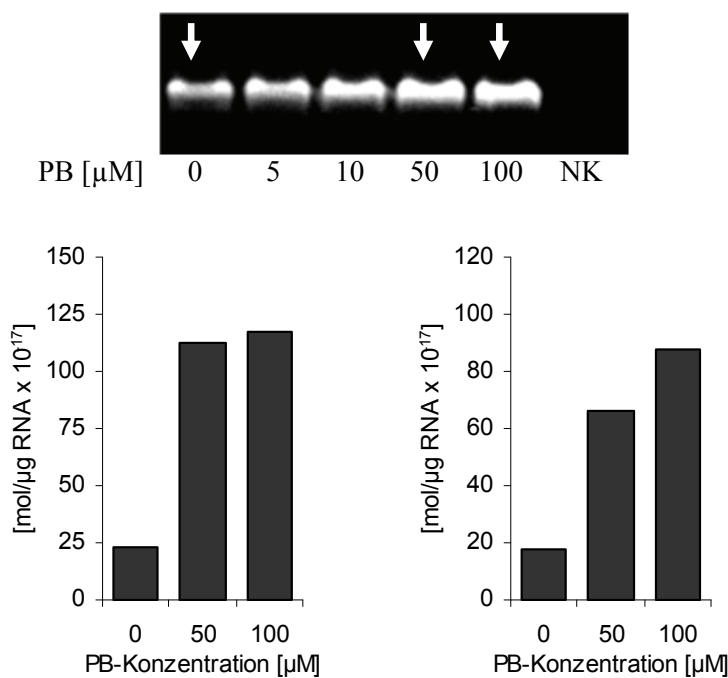
**Abb. 5.3** PROD- und 16 $\beta$ -TH-Aktivität in Leberschnitten DEXA-vorbehandelter Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB in vitro; Darstellung arithmetischer Mittelwerte und Standardfehler, n = 6, signifikante Unterschiede (gepaarter t-Test, p < 0,05) zur Kontrollgruppe ohne PB = \* mittlere Aktivitäten der Lebern vor der Schnittpräparation: 26 (PROD) bzw. 29 (16 $\beta$ -TH) pmol x min<sup>-1</sup> x mg Protein<sup>-1</sup>

### 5.2.3 CYP2B1-mRNA

Aus den Leberschnitten zweier stichprobenartig ausgewählter Tiere wurden die spezifischen RT-PCR-Produkte des CYP2B1 bestimmt.

In Abb. 5.4 (oben) ist das Ergebnis der Übersichts-PCR aller Proben eines Tieres dargestellt. Für die mit Pfeilen gekennzeichneten Gruppen wurde anschließend der CYP2B1-mRNA-Gehalt ermittelt (s. Abb. 5.4 unten).

In den Leberschnitten ohne Zusätze ist zu sehen, dass beide Tiere über den gleich niedrigen CYP2B1-mRNA-Gehalt verfügten und demzufolge ähnliche Ausgangslagen besaßen. Nach 24stündiger Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  oder 100  $\mu\text{M}$  PB kam es zu einem deutlichen Anstieg des CYP2B1-mRNA-Gehaltes. Bei beiden Tieren ließ sich mit Einsatz der hohen PB-Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) der CYP2B1-mRNA-Gehalt auf das 5fache steigern.



**Abb. 5.4** CYP2B1-mRNA-Expression in Leberschnitten DEXA-vorbehandelter Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB in vitro

**oben:** Elektrophorese der spezifischen RT-PCR-Produkte (380 bp) von allen Gruppen eines Tieres; Angabe der PB-Konzentration als Zahl unter den Banden, NK = Negativkontrolle, Pfeile = Kennzeichnung der Gruppen, für die eine Quantifizierung vorgenommen wurde (Ergebnis unten)

**unten:** CYP2B1-mRNA-Konzentration als Ergebnis kompetitiver RT-PCR, Darstellung der Einzelwerte aus Leberschnitten von zwei Tieren

## **5.3 Einfluss von DEXA in vitro auf die CYP2B1-Induzierbarkeit in Leberschnitten**

Anhand dieser Versuchsserien sollte untersucht werden, welche Interaktionen entstehen, wenn beide Modellinduktoren kombiniert in vitro Leberschnitten unbehandelter Tiere zugegeben werden. Dabei wurden DEXA und PB simultan sowie sukzessiv eingesetzt. Es wurden jeweils zwei Versuchsreihen durchgeführt, die sich hinsichtlich der DEXA-Konzentrationen unterschieden.

Es sollte erfasst werden, wie sich die CYP3A1-induzierende (1  $\mu\text{M}$ ) und nichtinduzierende (0,01  $\mu\text{M}$ ) DEXA-Konzentration auf die PB abhängige CYP2B1-Induktion auswirken.

In allen folgenden Serien wurden stets zum Vergleich Gruppen ohne DEXA mitgeführt, die ganz ohne Induktorexposition blieben oder 50  $\mu\text{M}$  PB allein enthielten.

In den Abschnitten 5.3.1 und 5.3.2 wird die jeweilige 2 $\beta$ -TH-Aktivität als Maß für die erwartete CYP3A1-Induktion durch DEXA vorangestellt, um zu zeigen, wie wirksam die eingesetzten DEXA-Konzentrationen hinsichtlich der CYP3A-Aktivitätssteigerung waren. Danach erfolgt gemäß der Fragestellung die Darstellung der CYP2B1-Induktion.

### **5.3.1 PB-Exposition gleichzeitig mit DEXA in vitro**

#### **5.3.1.1 Kontrolle des DEXA-Effekts: 2 $\beta$ -TH**

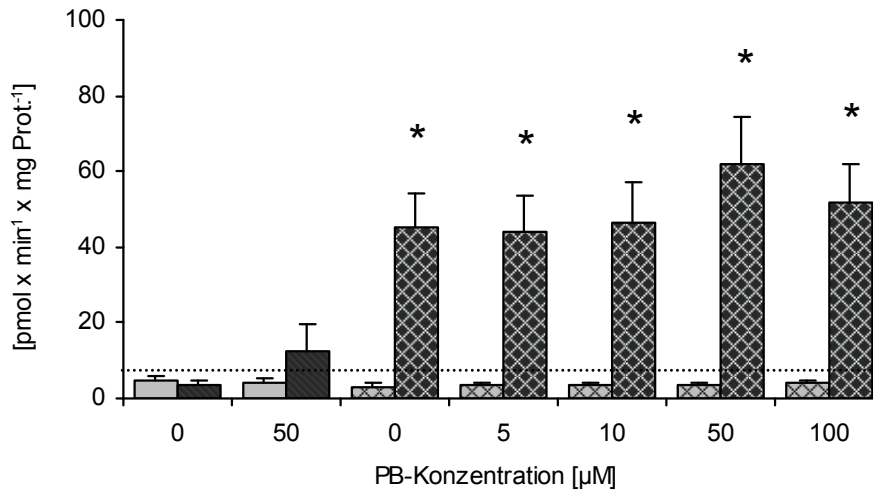
Im Leberschnittgewebe vor der Schnittpräparation und den Kontrollgruppen ohne Zusätze waren niedrige 2 $\beta$ -TH Aktivitäten nachweisbar.

PB allein besaß keinen signifikanten Effekt auf die CYP3A-abhängige 2 $\beta$ -TH-Aktivität und beeinflusste in dieser Versuchsserie die DEXA -vermittelte CYP3A1-Induktion nicht.

Abb. 5.5 zeigt, dass die niedrige DEXA-Konzentration (0,01  $\mu\text{M}$ ) keine CYP3A1-Induktion auslöste (hellgraue Säulenreihe). Die Enzymaktivitäten blieben in allen Gruppen sehr niedrig (2 $\beta$ -TH: 3 - 5  $\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$ ). Es waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

Durch den Einsatz von 1  $\mu\text{M}$  DEXA wurden in allen Gruppen auf ähnlichem Niveau signifikant gesteigerte Aktivitäten der 2 $\beta$ -TH nachgewiesen (Abb. 5.5, schwarze Säulenreihe). Die für die Kombinationsgruppen berechneten Induktionsfaktoren lagen zwischen 13 und

18. Damit wurde gezeigt, dass die hohe DEXA-Konzentration (1  $\mu\text{M}$ ) erwartungsgemäß die CYP3A1-abhängige Aktivität in vitro steigerte.



**Abb. 5.5** 2 $\beta$ -TH-Aktivität in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24stündiger PB-Exposition ohne und mit gleichzeitiger DEXA-Exposition in vitro; grau-gemusterte Säulen = 0,01  $\mu\text{M}$  DEXA, schwarz-gemusterte Säulen = 1  $\mu\text{M}$  DEXA, Säulenpaare ohne Musterung = Vergleichsgruppen ohne DEXA, horizontale Linie = 2 $\beta$ -TH-Aktivität in Lebergewebe vor der Schnittpräparation n=12, Darstellung arithmetischer Mittelwerte und Standardfehler; n = jeweils 6, signifikante Unterschiede (gepaarter t-Test,  $p < 0,05$ ) zur Vergleichsgruppe ohne Zusätze (erstes Säulenpaar) = \*

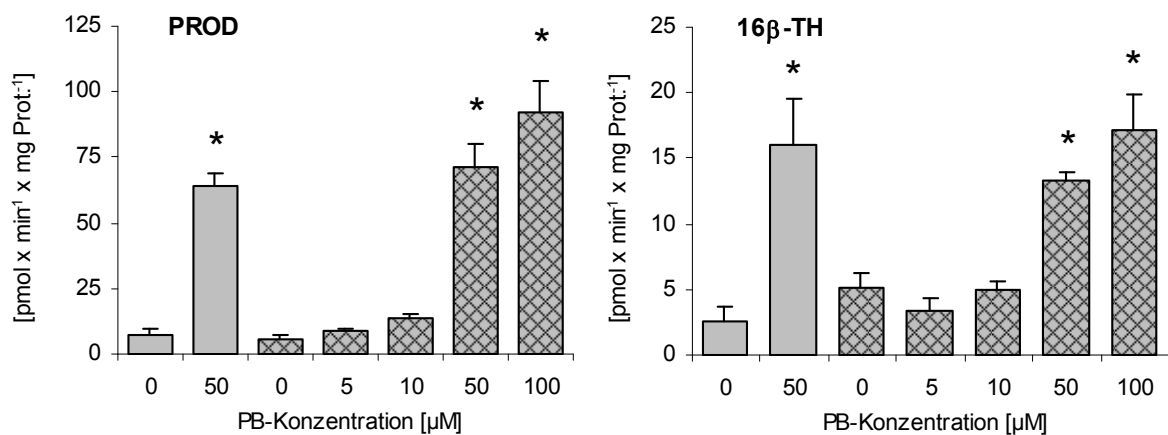
### 5.3.1.2 Einfluss von 0,01 $\mu\text{M}$ DEXA

#### 5.3.1.2.1 CYP2B1-Aktivität

Nach simultaner Schnittinkubation mit 0,01  $\mu\text{M}$  DEXA und PB konnte mit zunehmender PB-Konzentration eine Steigerung der PROD- und der 16 $\beta$ -TH-Aktivitäten nachgewiesen werden. (Abb. 5.6)

Nach 100  $\mu\text{M}$  PB betrug der mittlere Induktionsfaktor für die PROD 16, für die 16 $\beta$ -TH 3.

Vergleicht man bei beiden Nachweisreaktionen die Kontrollgruppen, die 50  $\mu\text{M}$  PB enthielten, mit den Kombinationsgruppen, die 50  $\mu\text{M}$  PB und 0,01  $\mu\text{M}$  DEXA enthielten, so sind keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Enzymaktivitäten festzustellen. Damit wurde gezeigt, dass die niedrige DEXA-Konzentration die PB-abhängige CYP2B1-Induktion nicht beeinflusst.



**Abb. 5.6** PROD- und 16 $\beta$ -TH-Aktivität in Leberschnitten un behandelter weiblicher Ratten nach 24stündiger PB-Exposition ohne (ungemusterte Säulen) und mit (karierte Säulen) gleichzeitiger DEXA-Exposition in vitro (0,01  $\mu\text{M}$ ); Darstellung arithmetischer Mittelwerte und Standardfehler,  $n = 6$ , signifikante Unterschiede (gepaarter t-Test,  $p < 0,05$ ) zur zugehörigen Kontrollgruppe "0" = \*; mittlere Aktivitäten der Lebern vor der Schnittpräparation: 14 (PROD) bzw. 6 (16 $\beta$ -TH)  $\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$

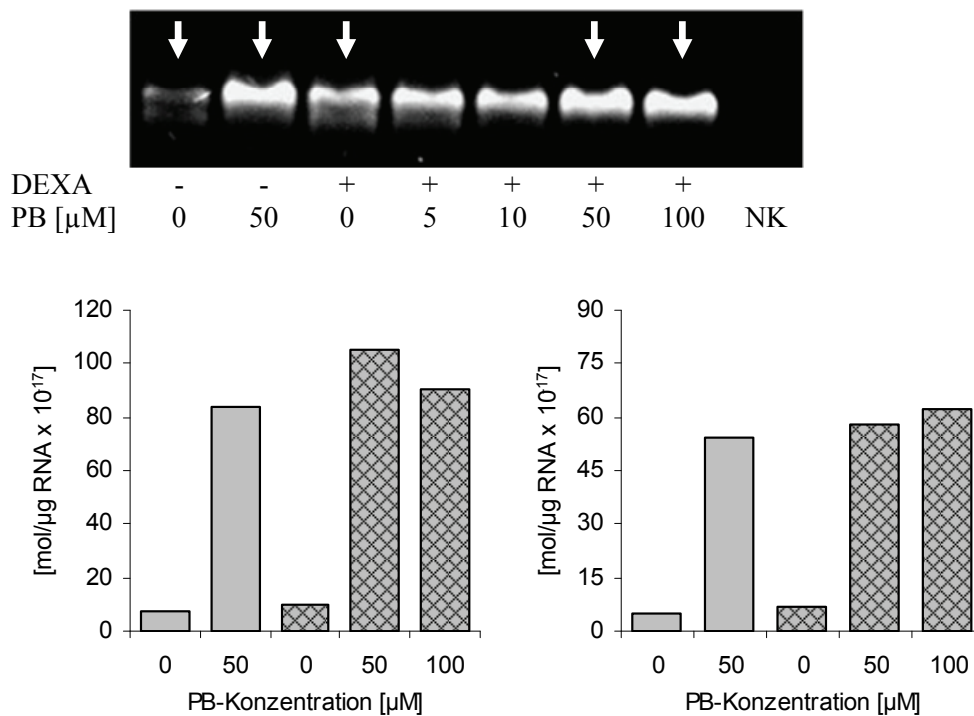
#### 5.3.1.2.2 CYP2B1-mRNA

Abb. 5.7 zeigt oben exemplarisch die Übersichts-PCR aller Proben eines Tieres. Für die mit Pfeilen gekennzeichneten Banden wurde der Gehalt an CYP2B1-mRNA bestimmt und dargestellt (s. Abb. 5.7 unten).

Bei beiden Stichproben (ausgewählte Gruppen von 2 Tieren) ist in der Kontrollgruppe ohne Zusätze und in der Gruppe mit 0,01  $\mu\text{M}$  DEXA, d.h. in den Gruppen ohne PB, ein niedriger CYP2B1-mRNA-Gehalt bestimmt worden.

In den Kombinationsgruppen mit 0,01  $\mu\text{M}$  DEXA und 50  $\mu\text{M}$  bzw. 100  $\mu\text{M}$  PB wurde ein Anstieg der CYP2B1-mRNA-Gehalte nachgewiesen, der sich von dem durch PB allein nicht unterschied. In allen Gruppen wurde eine mehr als 10fache Steigerung gegenüber der Kontrollgruppe ohne Zusätze erreicht.

Die niedrige DEXA-Konzentration scheint demnach die CYP2B1-mRNA und deren Induktion nicht zu beeinflussen.



**Abb. 5.7** CYP2B1-mRNA-Expression in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB in vitro gleichzeitig mit 0,01  $\mu\text{M}$  DEXA

**oben:** Elektrophorese der spezifischen RT-PCR-Produkte (380 bp) von allen Gruppen eines Tieres; Angabe der PB-Konzentration als Zahl unter den Banden, NK = Negativkontrolle, + = Gruppen mit DEXA-Exposition, Pfeile = Kennzeichnung der Gruppen, für die eine Quantifizierung vorgenommen wurde (Ergebnis unten)

**unten:** CYP2B1-mRNA-Konzentration als Ergebnis kompetitiver RT-PCR, Darstellung der Stichproben aus 2 Lebern, ungemusterte Säulen = PB allein, karierte Säulen = PB mit DEXA

### 5.3.1.3 Einfluss von 1 $\mu\text{M}$ DEXA

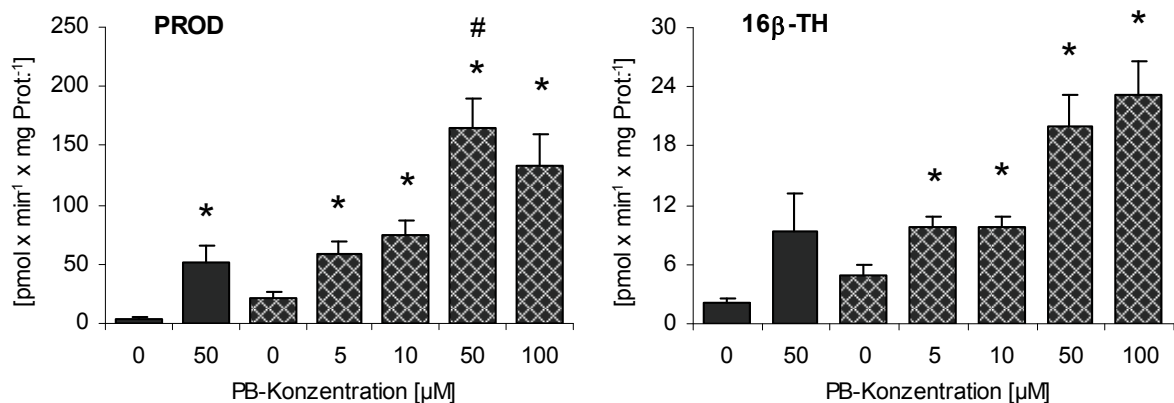
#### 5.3.1.3.1 CYP2B1-Aktivität

Schon der alleinige Einsatz von 1  $\mu\text{M}$  DEXA hatte die Enzymaktivitäten beider Nachweisreaktionen erhöht.

Nach gleichzeitigem Einsatz von 1  $\mu\text{M}$  DEXA und PB in steigenden Konzentrationen konnte eine weitere Erhöhung der Enzymaktivitäten festgestellt werden, die für alle PB-Konzentrationen signifikant war (Abb. 5.8). Sie betrug das 3-8fache (PROD) bzw. 2-5fache (16 $\beta$ -TH) der Aktivitäten gegenüber den Proben mit DEXA allein.

Vergleicht man die Enzymaktivität der Kontrollgruppe, die nur 50  $\mu\text{M}$  PB enthielt, mit der Aktivität der Kombinationsgruppe, die 50  $\mu\text{M}$  PB und 1  $\mu\text{M}$  DEXA enthielt, so konnte für die PROD ein 3fach höherer Umsatz erreicht werden. Für die 16 $\beta$ -TH wurde die Aktivität circa verdoppelt.

Die PB-abhängige CYP2B1-Induktion wurde also durch die hohe DEXA-Konzentration nicht gestört, sondern eher begünstigt.



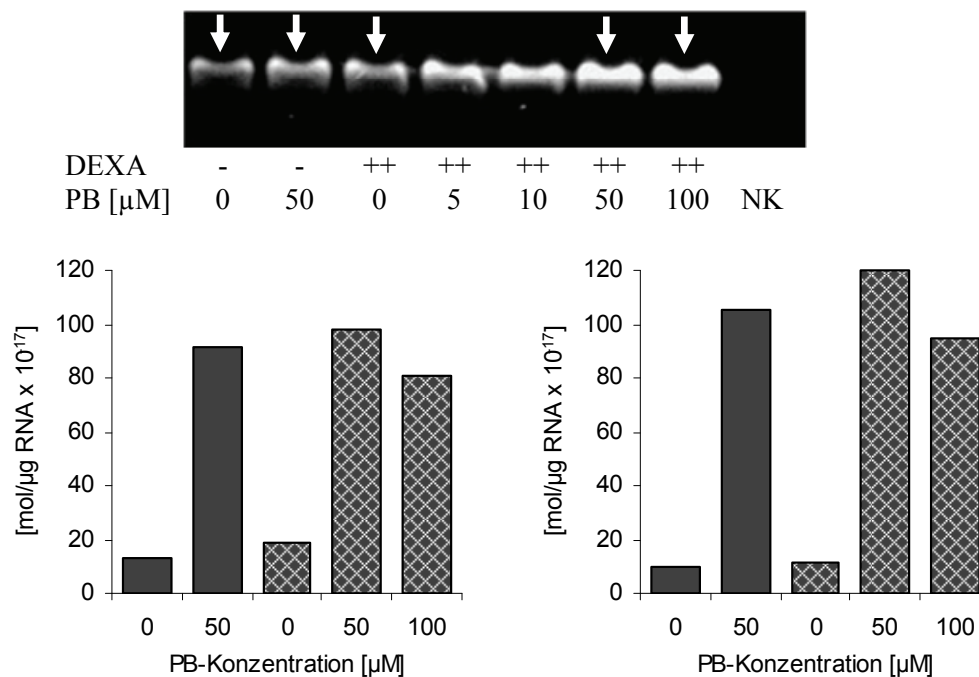
**Abb. 5.8** PROD- und 16 $\beta$ -TH-Aktivität in Leberschnitten unbehandelter weiblicher Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB ohne (ungemusterte Säulen) und mit (karierte Säulen) gleichzeitiger DEXA-Exposition in vitro (1  $\mu\text{M}$ ); Darstellung arithmetischer Mittelwerte und Standardfehler,  $n = 6$ , signifikante Unterschiede (gepaarter t-Test,  $p < 0,05$ ) zur zugehörigen Kontrollgruppe "0" = \*, zur Vergleichsgruppe mit 50  $\mu\text{M}$  PB ohne DEXA = #; mittlere Aktivitäten der Lebern vor der Schnittpreparation: 17 (PROD) bzw. 5 (16 $\beta$ -TH)  $\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$



### 5.3.1.3.2 CYP2B1-mRNA

Von den Proben zweier Tiere wurden, wie in den vorherigen Versuchsreihen, die spezifischen RT-PCR-Produkte des CYP2B1 bestimmt. In Abb. 5.9 ist oben exemplarisch die Übersichts-PCR aller Proben eines Tieres zu sehen. Es werden ebenfalls die Ergebnisse der kompetitiven RT-PCR ausgewählter Gruppen beider Tiere gezeigt (s. Abb. 5.9 unten). Die absoluten CYP2B1-mRNA-Konzentrationen waren bei beiden Tieren ähnlich. In der Gruppe ohne Zusätze sowie mit 1  $\mu\text{M}$  DEXA allein wurden wiederum niedrige CYP2B1-mRNA-Gehalte bestimmt. In den Gruppen mit PB allein und den Kombinationsgruppen mit PB und DEXA wurden gleichermaßen höhere CYP2B1-mRNA-Gehalte erzielt, die das 6-13fache der Kontrollen ohne Zusätze betragen.

Damit wurde auch die CYP2B1-mRNA-Induktion durch die hohe DEXA-Konzentration nicht gestört.



**Abb. 5.9** CYP2B1-mRNA-Expression in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB in vitro gleichzeitig mit 1  $\mu\text{M}$  DEXA

**oben:** Elektrophorese der spezifischen RT-PCR-Produkte (380 bp) von allen Gruppen eines Tieres; Angabe der PB-Konzentration als Zahl unter den Banden, NK = Negativkontrolle, ++ = Gruppen mit DEXA-Exposition, Pfeile = Kennzeichnung der Gruppen, für die eine Quantifizierung vorgenommen wurde (Ergebnis unten)

**unten:** CYP2B1-mRNA-Konzentration als Ergebnis kompetitiver RT-PCR, Darstellung der Stichproben aus 2 Lebern, ungemusterte Säulen = PB allein, karierte Säulen = PB mit DEXA

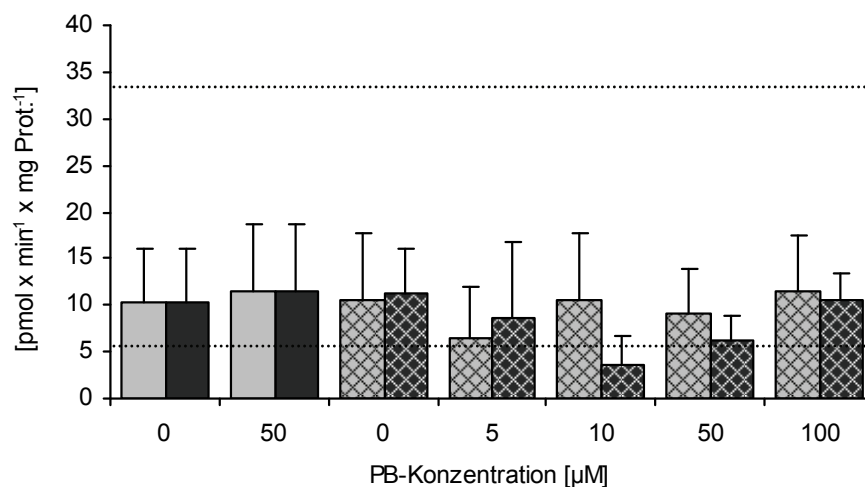
### 5.3.2 PB-Exposition nach vorangegangener DEXA-Exposition in vitro

#### 5.3.2.1 Kontrolle des DEXA-Effekts: 2 $\beta$ -TH

Nach 24stündiger Inkubation mit 0,01  $\mu$ M DEXA war kein Anstieg der 2 $\beta$ -TH-Aktivität nachweisbar. Im Vergleich dazu führte die Exposition mit 1  $\mu$ M DEXA über 24 Stunden erwartungsgemäß zu einer signifikanten Steigerung der CYP3A1-katalysierten 2 $\beta$ -TH. Dies entsprach dem im vorherigen Versuch (siehe Abschnitt 5.3.1.1) gezeigten DEXA-Effekt. In Abb. 5.10 sind diese Ergebnisse in Form von Horizontalen abgebildet. Die untere Horizontale zeigt die Ergebnisse für 0,01  $\mu$ M DEXA, die obere für 1  $\mu$ M DEXA.

Wurde die Inkubation für weitere 24 Stunden ohne DEXA und mit PB-Zusatz fortgeführt, so war der Effekt von 1  $\mu$ M DEXA nicht mehr nachweisbar. Die 2 $\beta$ -TH-Aktivitäten waren vergleichbar mit der Ausgangsaktivität der Kontrollgruppe.

Eine CYP3A1-Induktion, vorhanden zum Zeitpunkt der PB-Zugabe, war demnach nach der zweiten Inkubationsperiode mit PB vollständig abgeklungen.



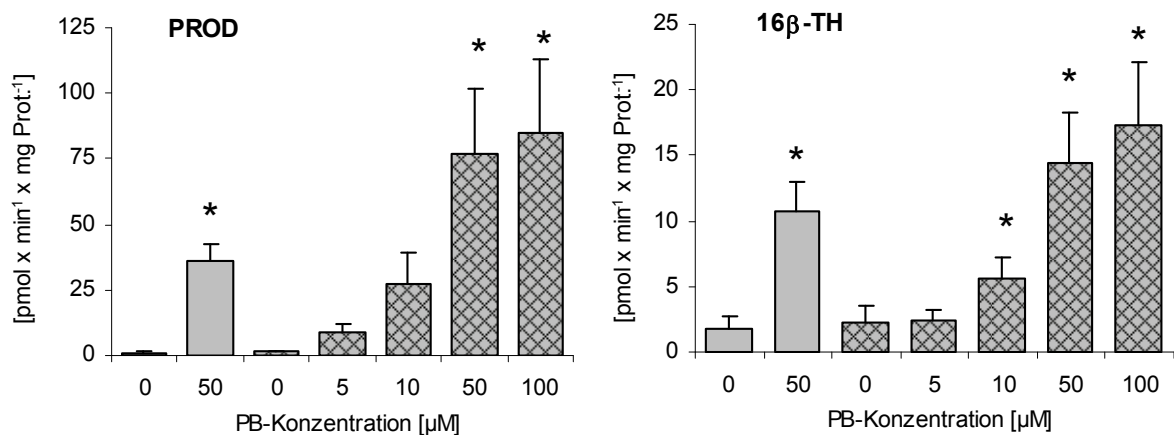
**Abb. 5.10** 2 $\beta$ -TH-Aktivität in Leberschnitten unbehauelter Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB ohne (ungemusterte Säulen) und mit (karierte Säulen vorangegangener 24stündiger DEXA-Exposition in vitro (Serie mit 0,01  $\mu$ M DEXA = helle Säulen, mit 1  $\mu$ M DEXA = dunkle Säulen); Gesamtinkubation = 48 Stunden; horizontale Linien = Aktivität nach 24stündiger DEXA-Exposition vor PB-Zugabe (untere Linie 0,01  $\mu$ M DEXA, obere Linie 1  $\mu$ M DEXA), Darstellung arithmetischer Mittelwerte und Standardfehler; n = 5

### 5.3.2.2 Einfluss von 0,01 $\mu\text{M}$ DEXA

#### 5.3.2.2.1 CYP2B1-Aktivität

Die Kontrollgruppen wiesen nach 48stündiger Inkubation eine sehr geringe PROD- und 16 $\beta$ -TH-Aktivität auf. Insgesamt war ein Induktionseffekt mit steigenden PB-Konzentrationen zu sehen. Die höchsten Enzymaktivitäten wurden für beide Nachweisreaktionen in den Kombinationsgruppen mit der höchsten PB-Konzentration erreicht (Abb. 5.11). Die Absolutwerte der PROD und 16 $\beta$ -TH nach sukzessiver DEXA- und PB-Exposition waren denen nach simultaner Exposition ähnlich (siehe Abb. 5.6) und unwesentlich höher als nach alleiniger PB Zugabe.

In den Kombinationsgruppen mit 0,01  $\mu\text{M}$  DEXA und 50  $\mu\text{M}$  bzw. 100  $\mu\text{M}$  PB wurde die PROD-Aktivität aufgrund der sehr niedrigen Rate der Bezugsgruppe mehr als 50fach gesteigert, die 16 $\beta$ -TH-Aktivität 7-8fach bei hoher Varianz für beide Reaktionen.



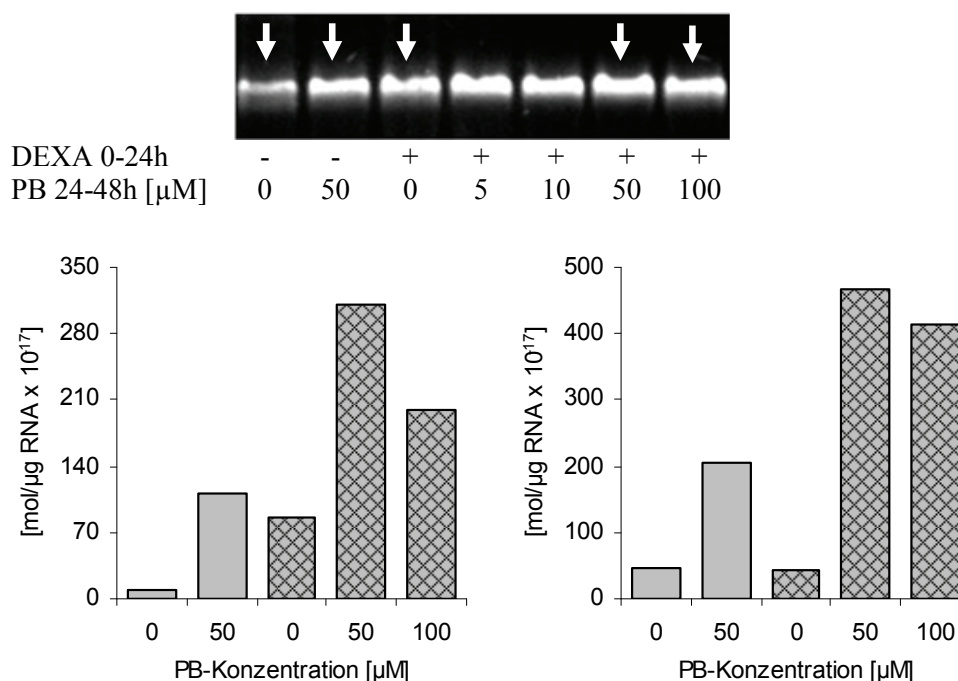
**Abb. 5.11** PROD- und 16 $\beta$ -TH-Aktivität in Leberschnitten un behandelter Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB ohne (ungemusterte Säulen) und mit (karierte Säulen) vorangegangener 24stündiger DEXA-Exposition *in vitro*; DEXA = 0,01  $\mu\text{M}$ , Gesamtinkubation = 48 Stunden; Darstellung arithmetischer Mittelwerte und Standardfehler; (PROD n = 6, TH n = 5); signifikante Unterschiede (gepaarter t-Test, ( $p < 0,05$ ) zur zugehörigen Kontrollgruppe ohne PB = \*

#### 5.3.2.2.2 CYP2B1-mRNA

In Abb. 5.12 ist wieder exemplarisch die Übersichts-PCR aller Proben eines Tieres zu sehen.

Die Pfeile markieren die zur CYP2B1-mRNA-Quantifizierung ausgewählten Gruppen mit Darstellung der Ergebnisse als Säulendiagramme.

Es ist erkennbar, dass gewisse Unterschiede der Absolutwerte beider Stichproben und auch der relativen Expressionssteigerungen bestanden, die aber in Anbetracht der methodischen Schwankungen in der gleichen Größenordnung lagen. Die Kontrollgruppen ohne Zusätze wiesen niedrige CYP2B1-mRNA-Gehalte auf, die durch PB allein 5- oder 12fach gesteigert wurden. Nach DEXA allein hatte sich die Expression in den Leberschnitten eines Tieres nicht verändert, in der anderen Stichprobe 9fach erhöht. Durch sukzessive Inkubation mit 0,01  $\mu\text{M}$  DEXA und PB (50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) wurde in den Leberschnitten beider Tiere ein weiterer Anstieg des CYP2B1-mRNA-Gehaltes erreicht. Die Induzierbarkeit der CYP2B1-mRNA durch PB wurde also nach vorangegangener Inkubation mit 0,01  $\mu\text{M}$  DEXA nicht gestört, sondern wiederum eher verbessert.



**Abb. 5.12** CYP2B1-mRNA-Expression in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB *in vitro* im Anschluss an eine 24stündige Inkubation ohne oder mit 0,01  $\mu\text{M}$  DEXA, Gesamtinkubation 48 Stunden

**oben:** Elektrophorese der spezifischen RT-PCR-Produkte (380 bp) von allen Gruppen eines Tieres; Angabe der PB-Konzentration als Zahl unter den Banden, + = Gruppen nach DEXA-Exposition, Pfeile = Kennzeichnung der Gruppen, für die eine Quantifizierung vorgenommen wurde (Ergebnis unten)

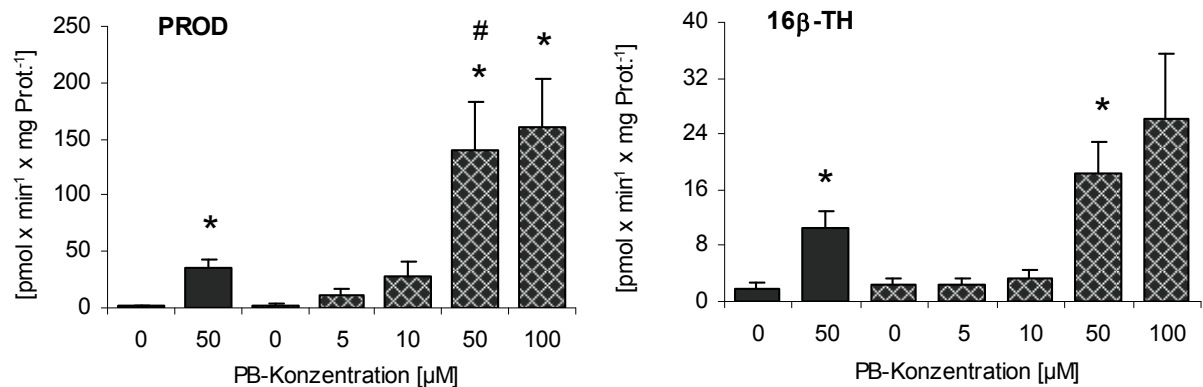
**unten:** CYP2B1-mRNA-Konzentration als Ergebnis kompetitiver RT-PCR, Darstellung der Stichproben aus 2 Lebern, ungemusterte Säulen = PB allein, karierte Säulen = PB nach DEXA

### 5.3.2.3 Einfluss von 1 $\mu$ M DEXA

#### 5.3.2.3.1 CYP2B1-Aktivität

Nach 48stündiger Inkubation waren in den Gruppen ohne PB nur sehr geringe PROD- und 16 $\beta$ -TH-Aktivitäten vorhanden. In den Kombinationsgruppen konnte bei beiden Modellreaktionen eine CYP2B1-Induktion nach Einsatz von 50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M PB nachgewiesen werden (Abb. 5.13), der bei der PROD die Wirkung von PB allein überstieg. Der mittlere Induktionsfaktor war für die PROD größer als 50 und lag für die 16 $\beta$ -TH bei 7-10.

Damit wurde erneut die konzentrationsabhängige Induktion von PROD und 16 $\beta$ -TH mittels PB durch DEXA nicht gestört, sondern eher verstärkt.

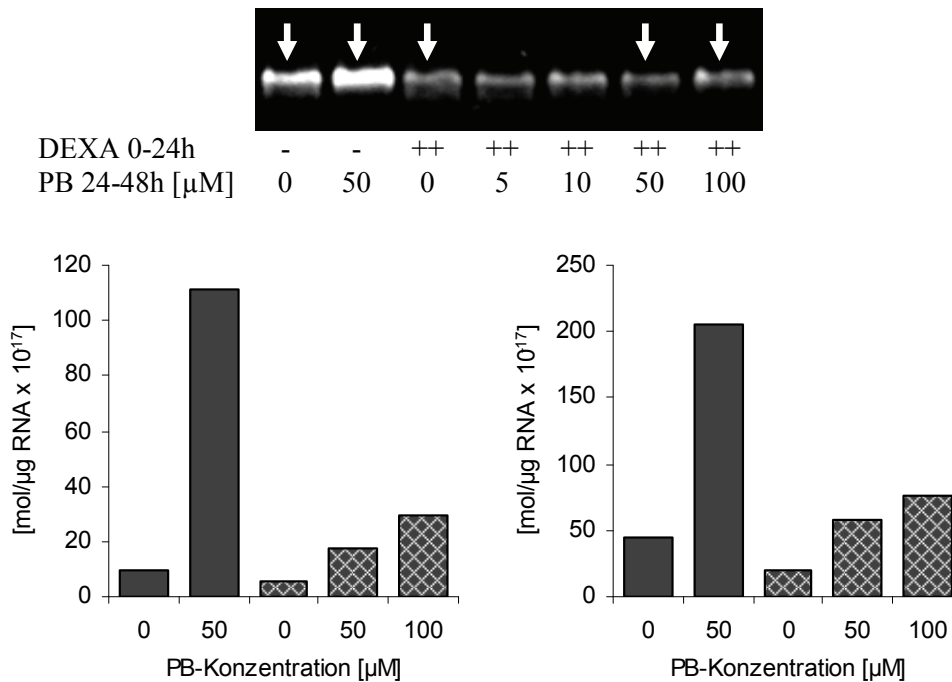


**Abb. 5.13** PROD- und 16 $\beta$ -TH-Aktivität in Leberschnitten un behandelter Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB ohne (ungemusterte Säulen) und mit (karierte Säulen) vorangegangener 24stündiger DEXA-Exposition *in vitro*; DEXA= 1  $\mu$ M, Gesamtinkubation = 48 Stunden; Darstellung arithmetischer Mittelwerte und Standardfehler; (PROD n = 6, TH n = 5); signifikante Unterschiede (gepaarter t-Test, ( $p < 0,05$ ) zur zugehörigen Kontrollgruppe ohne PB = \*, zur Vergleichsgruppe mit PB 50  $\mu$ M ohne DEXA = #

#### 5.3.2.3.2 CYP2B1-mRNA

In dem in Abb. 5.14 exemplarisch dargestellten Ergebnis einer Übersichts-RT-PCR aller Proben eines Tieres waren die relativ dünnen Banden der Kombinationsgruppen auffällig. Das kann für einen niedrigen CYP2B1-mRNA-Gehalt sprechen, der dann mittels kompetitiver RT-PCR quantitativ bewiesen wurde. Die höchste CYP2B1-mRNA-Expression wurde bei beiden Tieren in der Gruppe erreicht, die nur 50  $\mu$ M PB enthielt, die Steigerung betrug in diesen beiden Stichproben das 5- bzw. 12fache. In den Kombinationsgruppen waren niedrigere CYP2B1-mRNA-Gehalte zu sehen. Damit schien die vorangegangene

CYP3A1-Induktion durch 1  $\mu\text{M}$  DEXA die PB-abhängige CYP2B1-Induktion auf Ebene der mRNA zu inhibieren. Trotz dieser Veränderungen blieb die Induzierbarkeit der CYP2B1-Expression durch PB auf niedrigem Niveau erhalten. Es wurde eine 3-5fache Erhöhung des mRNA-Gehaltes gegenüber der Gruppe nach 1  $\mu\text{M}$  DEXA ohne PB-Exposition erreicht.



**Abb. 5.14** CYP2B1-mRNA-Expression in Leberschnitten un behandelter Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB in vitro im Anschluss an eine 24stündige Inkubation ohne oder mit 1  $\mu\text{M}$  DEXA, Gesamtinkubation 48 Stunden

**oben:** Elektrophorese der spezifischen RT-PCR-Produkte (380 bp) von allen Gruppen eines Tieres; Angabe der PB-Konzentration als Zahl unter den Banden, ++ = Gruppen nach DEXA-Exposition, Pfeil = Kennzeichnung der Gruppen, für die eine Quantifizierung vorgenommen wurde (Ergebnis unten)

**unten:** CYP2B1-mRNA-Konzentration als Ergebnis kompetitiver RT-PCR, Darstellung der Stichproben aus 2 Lebern, ungemusterte Säulen = PB allein, karierte Säulen = PB nach DEXA

## 6 Diskussion

In den letzten Jahren publizierten zahlreiche Arbeitsgruppen die Vorteile von Präzisionsleberschnitten als geeignetes In-vitro-Modell zum Studium des Fremdstoffmetabolismus und der Hepatotoxizität (Lerche-Langrand und Toutain 2000, De Graaf et al. 2002). Wenige Untersuchungen beschäftigten sich bisher systematisch mit der In-vitro-Induzierbarkeit bestimmter CYP mit Gewebe, in dem zuvor schon eine CYP-Induktion stattgefunden hatte oder parallel ablief. Schwerpunkt vorliegender Arbeit war der Nachweis der CYP2B1-Induzierbarkeit an Rattenleberschnitten in vitro nach Vorbehandlung des Gewebes mit DEXA in vivo oder in vitro.

Es konnte gezeigt werden, dass in dem DEXA-exponierten Gewebe eine CYP2B1-Induktion in vitro ausgelöst werden kann und auf Enzymaktivitäts- und mRNA-Ebene uneingeschränkt nachweisbar ist. Lediglich der sukzessive Einsatz von 1  $\mu\text{M}$  DEXA und PB in vitro verursachte auf mRNA-Ebene eine Verminderung der absoluten CYP2B1-mRNA-Konzentration. Die Induktion blieb aber auf niedrigerem Niveau auslösbar.

Im Folgenden wird auf die einzelnen Befunde näher eingegangen.

### 6.1 CYP2B1-Induktion in vitro durch PB in Leberschnitten un- behandelter Ratten

Eine Induktion von Rattenleberschnitten in vitro mit PB war bisher stets mit Gewebe von männlichen Ratten durchgeführt worden. Dabei wurden z.B. im Institut für Pharmakologie und Toxikologie Jena relativ große Schwankungen der basalen und induzierten CYP2B-Expression auf Enzymaktivitäts- und mRNA-Ebene festgestellt (Stahmann 2003). Auch in der Literatur waren große Unterschiede in der Induzierbarkeit mit Faktoren zwischen 1, nicht induzierbar, (Gokhale et al. 1997) und 600 (Martignoni et al. 2004) zu finden. Bezüglich geschlechtsabhängiger Unterschiede der CYP2B1-Expression bei der Ratte gibt es widersprüchliche Angaben in der Literatur. Waxman et al. (1985) fanden keinen Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Ratten, wohingegen bei Agrawal & Shapiro (2003) die PROD bei männlichen Ratten höher als bei weiblichen war. Deshalb wurde in der ersten Versuchsserie zunächst die prinzipielle In-vitro-Induzierbarkeit des CYP2B1 in Leberschnitten unbehandelter weiblicher Ratten durch PB untersucht. PB kam in verschiedenen Konzentrationen (5, 10, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) zum Einsatz. Dies erfolgte in Anlehnung an frühere Befunde mit verschiedenen In-vitro-Modellen, in denen 100  $\mu\text{M}$  PB die optimal induzie-

rende Konzentration darstellte (Sidhu und Omiecinski 1995, Madan et al. 1999). Diese Konzentration hatte sich bereits mit Leberschnitten männlicher Ratten bewährt (Müller et al. 2000, Stahmann 2003, Lerch 2008). Sie führte dort ebenfalls zur maximalen PROD-Induktion, mit höheren Konzentrationen waren abnehmende Induktionsfaktoren zu verzeichnen (unveröffentlicht, persönliche Mitteilung Glöckner).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden mittels PROD die CYP2B1-Aktivitäten gemessen, die nach Zugabe der beiden hohen PB-Konzentrationen (50, 100  $\mu$ M) auf das 4fache signifikant gesteigert wurden. Diese Ergebnisse entsprechen Untersuchungen an Leberschnitten unbehandelter männlicher Ratten unter vergleichbaren Bedingungen (Müller et al. 2000), wobei sowohl in den eigenen Untersuchungen in nachfolgenden Versuchsreihen als auch in Versuchen mit Leberschnitten männlicher Ratten (Stahmann 2003, Lerch 2008) durchaus doppelt so hohe Induktionsfaktoren beobachtet wurden. Durch andere Arbeitsgruppen wurden ebenfalls stärkere Aktivitätssteigerungen um 7- bis 11fach mit Leberschnitten männlicher Ratten beschrieben, jedoch waren dort die Expositionszeiten länger (48 bis 96 Stunden) und die PB-Konzentrationen höher (Lake et al. 1993, 1996, Catania et al. 2007). Offenbar sind konkrete Versuchsbedingungen nicht ohne Einfluss, wie es mittels elektronenmikroskopischer Unterschiede zwischen verschiedenen Schnitten eines Organs oder verschiedenen Regionen innerhalb eines Schnittes sichtbar gemacht werden konnte (Neupert et al. 2003) und sich als Schwankungen der Befunde innerhalb einer Studie äußerte (Stahmann 2003). Desweiteren kann ein Polymorphismus für CYP2B1 nicht ausgeschlossen werden, wie für CYP2B6 beim Menschen bekannt (Zukunft et al. 2005, Hofmann et al. 2008). Larsen et al. (1994) berichteten z.B. über einen Polymorphismus in der hypophysären Steuerung der basalen CYP-Regulation bei der Ratte. Beschriebene Schwankungen der Enzymaktivitäten könnten möglicherweise mit der sehr komplexen CYP2B1-Regulation zusammenhängen, bei der neben der Genexpression selbst (Yamada et al. 2006) auch die Kontrolle der Transkriptionsfaktoren über den Phosphorylierungsgrad (Pustylnyak et al. 2005) und posttranskriptionelle Einflüsse wie mRNA-Protein-Interaktionen (Truong et al. 2005) oder die CYP-Phosphorylierung (Oesch-Bartlomowicz und Oesch 2008) eine Rolle spielen. Sogar eine unterschiedliche Nahrungszusammensetzung kann Auswirkungen haben (Larsen et al. 1994, Ronis et al. 1999). Schließlich sei erwähnt, dass die CYP2B-Expression nicht gleichmäßig über die Leber verteilt ist (Dail et al. 2007), so dass bei der Präparation der Leberschnitte unterschiedlich aktive Bereiche in den einzelnen Proben enthalten sein könnten.



Eine Bestimmung der CYP2B1-mRNA war in der ersten Kontrollserie nicht vorgenommen worden. Jedoch wurden in den nachfolgenden Versuchsreihen auch Stichproben mitgeführt, die nur PB-exponiert waren ohne Kombination mit DEXA. An einigen dieser Proben war die mRNA-Expression mit erfasst worden, so dass sich für Leberschnitte unbehandelter Rattenweibchen eine ca. 10fache Steigerung durch 50  $\mu$ M PB innerhalb von 24 Stunden ergab (n=4). Damit konnte auch auf Ebene der mRNA eine CYP2B1-Induktion durch PB in vitro sicher ausgelöst werden. Unter vergleichbaren Bedingungen wurden mit Leberschnitten männlicher Ratten nach Einsatz von 100  $\mu$ M PB CYP2B1-mRNA-Gehalte in gleicher Größenordnung gemessen, mittlere Induktionsfaktoren von 6 (Stahmann 2003), 19 (Lerch 2008), oder 60 (Müller et al. 2000) erreicht und ebenfalls starke Unterschiede zwischen den einzelnen Stichproben beobachtet. Auch andere Arbeitsgruppen erzielten unter abweichenden Bedingungen Induktionsfaktoren in der gleichen Größenordnung (Pan et al. 2002, Meredith et al. 2003, Cui et al. 2005b). Eine Arbeitsgruppe erzielte mit 10fach höheren PB-Konzentrationen einen Induktionsfaktor von 600 (Martignoni et al. 2004), wobei aber aufgrund der Bestimmungsmethode (real time RT-PCR) keine Absolutwerte und keine Angaben zur Basalexpression vorliegen, die den sehr hohen Faktor möglicherweise erklären könnten.

Insgesamt konnte also in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass Leberschnitte weiblicher Ratten für den Nachweis der CYP2B1-Induktion mit PB genauso gut geeignet sind wie diejenigen von Männchen. Im Vergleich zu den oben genannten Ergebnissen der Versuchsreihen mit männlichen Ratten wurden zwar relativ niedrige Enzymaktivitäten in den Leberschnitten der weiblichen Ratten gemessen, eine konzentrationsabhängige Induktion blieb aber erhalten. Die eigenen Befunde lagen im erwarteten Rahmen und konnten als Ausgangswerte für die vorgesehenen Kombinationsversuche verwendet werden.

## **6.2 CYP2B1-Induktion in vitro durch PB in Leberschnitten DEXA-vorbehandelter Ratten**

Der Schwerpunkt vorliegender Arbeit bestand darin, die Verwendbarkeit vorinduzierten Lebergewebes für In-vitro-Versuche in Leberschnitten zu untersuchen. Da der CYP3A-Induktor DEXA häufig als Medikament eingesetzt wird, sollte dessen Einfluss auf die CYP2B1-Induzierbarkeit in vitro geklärt werden. Dazu erfolgte die CYP2B1-Induktion in vitro an Leberschnitten weiblicher Ratten, die vorher über 3 Tage mit DEXA vorbehandelt worden waren. Verglichen mit Dosierungen im klinischen Alltag lag die verwendete

DEXA-Dosis von 3 x 4 mg/kg etwas über dem oberen Bereich üblicher Dosierungen bei akuter Gabe und weit über den Dosen bei chronischer Gabe.

Zunächst wurde die durch DEXA ausgelöste CYP3A1-Induktion mittels Messungen der 2 $\beta$ -TH-Aktivitäten kontrolliert. Im Lebergewebe vor Schnittpräparation zeigten sich 10fach höhere 2 $\beta$ -TH-Aktivitäten als im Lebergewebe unbehandelter Tiere. Damit verursachte die zur Vorbehandlung der Ratten eingesetzte DEXA-Dosis eine sichere CYP3A1-Induktion und Ergebnisse aus der Literatur mit Rattenleberschnitten konnten reproduziert werden: Lieder (2007) verwendete die gleiche DEXA-Vorbehandlung *in vivo* und wies mittels Messungen der CYP3A1-abhängigen 2 $\beta$ -, 6 $\beta$ - und 15 $\beta$ -TH-Aktivitäten eine CYP3A1-Induktion gleicher Größenordnung in Leberschnitten weiblicher Ratten nach. Auch Reinhardt (2009) arbeitete mit weiblichen Ratten und fand eine ähnliche Steigerung der 2 $\beta$ -TH-Aktivität. Meredith et al. (2003) lösten eine CYP3A1-Induktion *in vivo* in Leberschnitten männlicher Ratten aus, nachdem den Tieren über vier Tage 50 mg/kg DEXA oral verabreicht wurde. Es erfolgte die Messung der 6 $\beta$ -TH-Aktivität, die 6,4fach erhöht war.

Betrachtet man nun den verbliebenen DEXA-Effekt nach 24 stündiger Inkubation der von DEXA-behandelten Tiere stammenden Leberschnitte *in vitro*, so ist festzustellen, dass sich gemessene mittlere Aktivitäten nicht mehr signifikant von den Aktivitäten unbehandelter Lebern unterschieden. Damit ist die CYP3A1-Induktion nach 24 Stunden rasch abgeklungen. Auch dieses Ergebnis stimmt mit Befunden aus dem Jenaer Institut überein (Lieder 2007, Reinhardt 2009) und lässt sich mit der relativ kurzen Halbwertszeit des CYP3A1 erklären, die circa 14 Stunden beträgt (Watkins et al. 1986). Somit hielt während der 24stündigen PB-Exposition der vorbehandelten Leberschnitte *in vitro* der vorher erzeugte *In-vivo*-Effekt von DEXA nicht bis zum Versuchsende an, trotzdem lagen zu Beginn der PB-Exposition andere Bedingungen (ein verändertes CYP-Muster) vor als in Leberschnitten unbehandelten Ratten (sichtbar an den veränderten Basalaktivitäten im Gewebe vor der Schnittpräparation).

Von Bedeutung ist nun die DEXA-Wirkung *in vivo* auf eine mögliche CYP2B1-Induktion. Zur Einschätzung der CYP2B1-Aktivität (PROD) nach DEXA wurden Bestimmungen in den Lebern vor Schnittpräparation und in inkubierten Kontrollschnitten ohne PB-Exposition vorgenommen. Es zeigte sich, dass die alleinige *In-vivo*-Injektion von DEXA nur zu einer moderaten, aber nicht signifikanten Erhöhung der mittleren PROD-Aktivitäten

führte. Diese in eigener Arbeit gefundenen Ergebnisse decken sich mit den Befunden von Sherratt et al. (1989), die ebenfalls eine moderate, aber keine signifikante CYP2B-Aktivitätssteigerung (Verdopplung) nach intraperitonealer Injektion von  $2 \times 10$  mg/kg DEXA fanden. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die über eine signifikante CYP2B1-Induktion durch DEXA in vivo berichteten. Dabei ist anzumerken, dass dort viel höhere DEXA-Dosierungen, um das 12-40fache, an männlichen Ratten zur Anwendung kamen und zumeist die Induktion auf mRNA-Ebene untersucht wurde (Ronis et al. 1999, Meredith et al. 2003, Martignoni et al. 2004, Baldwin et al. 2006). Bei Ronis et al. (1999) und Meredith et al. (2003) wurden zusätzlich die PROD-Aktivitäten gemessen, die ca. 4- bzw. 7fach gegenüber unbehandelten Tieren erhöht waren. Es ist bekannt, dass DEXA in ausreichend hoher Konzentration über das Netzwerk verschiedener nukleärer Faktoren einschließlich PXR auch indirekt in die Regulation mehrerer CYP-Familien eingreifen kann, ohne z.B. über CAR eine CYP2B1-Induktion direkt auszulösen (Waxman 1999). Auch beim Menschen wurde über einen Einfluss von PXR auf die CYP2B6-Regulation berichtet (Goodwin et al. 2001). Somit ist anzunehmen, dass durch die von uns verwendete niedrigere, eher klinisch relevante Dosierung (noch) keine CYP2B1-Induktion auf Aktivitätsebene zu erwarten war.

Schließlich wurde die DEXA-Wirkung in vivo auf die In-vitro-Induzierbarkeit von CYP2B1 durch PB untersucht. Die Kombination aus Vorbehandlung der Tiere mit DEXA und anschließend erfolgter CYP2B1-Induktion durch PB in vitro an Präzisionsleberschnitten war bisher noch kein Bestandteil laufender Forschungen. Die Ergebnisse zeigten, dass nach Einsatz von PB in vitro in verschiedenen Konzentrationen höhere absolute PROD-Aktivitäten erreicht wurden als in Leberschnitten unbehandelter Tiere. Mittels Durchführung der zweiten Nachweisreaktion, der  $16\beta$ -TH, konnten die Befunde bestätigt werden. Diese Reaktion wurde zwar nicht in der ersten Kontrollserie mit Leberschnitten unbehandelter Weibchen gemessen, liegt jedoch aus den mitgeführten DEXA-freien Proben der anderen Versuchsserien zum Vergleich vor. Dort wurden mit  $50 \mu\text{M}$  PB lediglich 10-15 pmol/min/mg Protein erreicht (s. Abb. 5.6 und Abb. 5.8), während im DEXA-vorbehandelten Gewebe eine mittlere Aktivität von ca. 90 pmol/min/mg Prot. gemessen wurde (s. Abb. 5.3). Auch auf mRNA-Ebene war nach 24-stündiger Inkubation mit 50 und  $100 \mu\text{M}$  PB ein ausgeprägter Anstieg des CYP2B1-mRNA-Gehaltes zu verzeichnen (s. Abb. 5.4), der allerdings nicht wesentlich über denjenigen in Leberschnitten unbehandelter Ratten hinaus ging (vgl. Abb. 5.7 und Abb. 5.9). Somit scheint die Vorbehandlung der Tie-

re mit DEXA die In-vitro-Induktion von CYP2B1 durch PB nicht zu stören, sondern eher zu verstärken. Dies deckt sich mit Befunden von Reinhardt (2009), die unter den gleichen Bedingungen den Einfluss von DEXA in vivo auf die In-vitro-Induzierbarkeit von CYP1A1 durch BNF untersuchte. Hierbei wurde die CYP1A1-Induktion durch DEXA ebenfalls kaum gestört, sondern teilweise begünstigt. Auch bei reinen In-vivo-Versuchen, bei denen DEXA in relativ niedriger Dosis (2 x 10 mg/kg) zugleich mit PB (2 x 50 mg/kg) an Ratten verabreicht wurde, kam es im Vergleich zu PB allein zu keiner, bestenfalls geringfügig stärkeren Steigerung der PROD, ohne dass aber der CYP2B1-Gehalt erhöht wurde (Sherratt et al. 1989). Bei anderen Versuchen wurde eine Potenzierung des PB-Effekts auf mRNA-Ebene erst mit höheren DEXA-Dosen (ab 50 mg/kg) gefunden (Rao et al. 1990). Außerdem waren die Effekte auf nukleäre und zytoplasmatische Transkripte unterschiedlich, was die Komplexität der DEXA-Modulation unterstreicht. Da in der eigenen Arbeit eine eher niedrige DEXA-Dosis verwendet wurde, entsprechen die Resultate den aus der Literatur abzuleitenden Erwartungen. Versuche, bei denen DEXA und PB nacheinander in vivo verabreicht wurden, sind bisher nicht beschrieben.

Anhand oben diskutierter Befunde kann geschlussfolgert werden, dass sich in vivo CYP3A-vorinduziertes Lebergewebe zu In-vitro-Untersuchungen der CYP2B-Induktion in Leberschnitten verwenden lässt. Da die CYP2B-Induktion eher verbessert wird, könnten positive Effekte bei der Testung potentieller CYP2B-Induktoren zwar überbewertet werden, andererseits aber wäre das Auffinden eines latenten Induktionspotentials erleichtert.

### **6.3 Einfluss von DEXA in vitro auf die CYP2B1-Induzierbarkeit in Leberschnitten**

Mit Hilfe der durchgeführten In-vitro-Versuche wurde die Auswirkung der Induktorkombination PB und DEXA in vitro mit Beteiligung zweier CYP-Familien auf eine mögliche CYP2B1-Induktion untersucht. Gibt es Wechselwirkungen, wenn beide Induktoren gleichzeitig bzw. hintereinander in das Inkubationsmedium gegeben werden? Weiterhin wurden zwei DEXA-Konzentrationen eingesetzt, um den möglichen dualen DEXA-Einfluss zu prüfen, der an Rattenhepatozyten beobachtet wurde (Sidhu und Omiecinski 1995b, Kocarek und Reddy 1998, Burczynski et al. 2001, Ringel et al. 2002), sowie die Interaktion mit einem schwachen und einem starken CYP3A1-Induktor zu simulieren.

Hinsichtlich der Tatsache, dass DEXA häufig zu Kulturmedien gegeben wird, ist es wichtig dessen Einfluss auf eine mögliche CYP2B1-Induktion beurteilen zu können. Damit könnten ebenfalls Empfehlungen zur optimierten Zusammensetzung der Kulturmedien ausgesprochen werden.

### **6.3.1 PB-Exposition gleichzeitig mit DEXA in vitro**

DEXA wurde in CYP3A-induzierender (1  $\mu\text{M}$ ) und -nichtinduzierender (0,01  $\mu\text{M}$ ) Konzentration eingesetzt. Mittels Messungen der 2 $\beta$ -TH erfolgte wiederum die Überprüfung des Induktionsausmaßes. Erwartungsgemäß zeigte sich, dass die niedrige DEXA-Konzentration keinen signifikanten Effekt auf die CYP3A1-Aktivität besaß, die hohe DEXA-Konzentration (1  $\mu\text{M}$ ) jedoch stets eine CYP3A1-Induktion auslöste, und zwar unabhängig von den zusätzlich eingesetzten PB-Konzentrationen. Die Induktionsfaktoren, die zwischen 13 und 18 lagen, entsprechen Befunden aus Arbeiten unter den gleichen Bedingungen, bei denen mit 1  $\mu\text{M}$  DEXA mittlere Steigerungen der 2 $\beta$ -TH auf das 4-17fache beschrieben wurden (Glöckner et al. 2008, Reinhardt 2009, Demirdag 2010). Damit war die Voraussetzung gegeben, die CYP2B1-Induzierbarkeit unter Bedingungen erhöhter CYP3A-Aktivität zu untersuchen.

Da der gleichzeitige Zusatz von PB in verschiedenen Konzentrationen darauf keinen signifikanten Einfluss hatte, ist als Nebenbefund abzuleiten, dass PB unter den gegebenen Bedingungen keine nennenswerte CYP3A1-Induktion hervorruft. Durch PB allein (50  $\mu\text{M}$ ) war zwar eine gewisse Erhöhung der 2 $\beta$ -TH beobachtet worden, die aber nicht das Signifikanzniveau erreichte. Dies war jedoch nicht Untersuchungsgegenstand der Arbeit und soll daher hier nicht weiter diskutiert werden.

Die bei der simultanen Schnittexposition über 24 Stunden in vitro mit DEXA und PB erzielte Steigerung der PROD- und 16 $\beta$ -TH-Aktivitäten war durch 0,01  $\mu\text{M}$  DEXA nicht wesentlich beeinflusst und durch 1  $\mu\text{M}$  DEXA etwas verstärkt worden (s. Abb. 5.6 und Abb. 5.8). Dies betrifft die absoluten Enzymaktivitäten. Betrachtet man die Induktionsfaktoren, so waren diese bei Kombination mit 0,01  $\mu\text{M}$  DEXA ähnlich wie mit PB allein, mit 1  $\mu\text{M}$  DEXA aber niedriger. Das resultiert daher, dass 0,01  $\mu\text{M}$  DEXA keine eigene Wirkung auf die CYP2B1-Aktivität hatte, nach 1  $\mu\text{M}$  DEXA allein aber eine fast 5fach höhere PROD-Aktivität gemessen wurde als ohne DEXA. Damit trat der Effekt von 1  $\mu\text{M}$  DEXA allein in vitro deutlicher hervor als von der DEXA-Vorbehandlung in vivo (dort nur moderate Erhöhung der CYP2B1-Aktivität, s. Abschnitt 6.2), obwohl die absoluten PROD-

Aktivitäten sehr ähnlich waren (26 pmol/min/mg Protein 24 Stunden nach DEXA-Vorbehandlung und 21 pmol/min/mg Protein nach 24stündiger DEXA-Exposition *in vitro*). Hier zeigt sich, wie wichtig die Auswertung absoluter Enzymaktivitäten ist, die mehr Informationen liefert als die bloße Betrachtung von Induktionsfaktoren. Der DEXA-Effekt blieb bei den eigenen Versuchen auf die Aktivitätsebene beschränkt, ohne die CYP2B1-mRNA-Konzentration zu beeinflussen (s. Abb. 5.7 und Abb. 5.9). Bei Martignoni et al. (2004) hatten 100 µM DEXA über 24 Stunden eine Steigerung der CYP2B1-mRNA in Leberschnitten männlicher Ratten bewirkt, allerdings waren neben den Faktoren keine Absolutwerte angegeben, was die Bewertung erschwert. Die offenbar konzentrationsabhängige Steigerung der CYP2B-Funktion durch DEXA *in vitro*, ein Nebenbefund bei der Untersuchung der CYP2B1-Induzierbarkeit, ist bereits aus der Literatur bekannt und auch dort nicht auf die Enzymaktivitätsebene beschränkt. Mögliche Mechanismen dafür werden z.B. bei Audet-Walsh & Anderson (2009) diskutiert, sollen aber hier nicht näher betrachtet werden. Eine CYP-stabilisierende Wirkung von DEXA in Hepatozytenkulturen, die ebenfalls konzentrationsabhängig auftrat (Kocarek et al. 1994), oder eine antiapoptotische Wirkung in Hepatozytenlinien (Wanke et al. 2004) sind nur bedingt mit Wirkungen in Leberschnitten vergleichbar, da durch die Zellisolation andere Genexpressionsverhältnisse mit deutlicheren Abweichungen zur Situation *in vivo* vorliegen (Boess et al. 2003, Elaut et al. 2006). Auch Befunde einer Potenzierung oder Hemmung der CYP2B1-Induktion mit PB in Abhängigkeit von der DEXA-Konzentration, die mit Hepatozytenkulturen erforscht wurden, sind nicht direkt mit den an Leberschnitten erhobenen Befunden vergleichbar und stehen den eigenen Ergebnissen z.T. entgegen.

So fanden Ringel et al (2002) an Rattenhepatozyten, dass niedrige DEXA-Konzentrationen von 0,03-0,1 µM, einen potenzierenden Effekt auf die CYP2B1/2-Induktion durch PB besitzen. Mit dem Zusatz von 0,03 µM DEXA wurde eine 18fache Steigerung der PB-induzierten 16β-TH-Aktivität erzielt. Im Gegensatz dazu hatte eine hohe DEXA-Konzentration (z.B. 1 µM) einen suppressiven Effekt auf die CYP2B1/2-Induktion durch PB, es kam zu einer 5fachen Reduktion der PB-vermittelten 16β-TH-Induktion (geringerer Induktionsfaktor bei höheren basalen und induzierten Aktivitäten).

Verschiedene andere Studien an Rattenhepatozyten zeigten, dass der Zusatz von DEXA zum Medium die CYP2B1/2-Induktion durch PB auch auf mRNA-Ebene beeinflusst und je nach DEXA-Konzentration steigernd bzw. hemmend wirkt, ohne dass DEXA selbst die spezifische mRNA veränderte (Sidhu und Omiecinski 1995, Kocarek und Reddy 1998,

Burczynski et al. 2001). Außerdem ist bekannt, dass DEXA die Induktion von CYP2B-, CYP2C- und CYP3A-Isoformen an menschlichen Hepatozyten potenziert (Gerbai-Chaloin et al. 2001).

Mit Leberschnitten gibt es fast keine vergleichbaren Kombinationsversuche. Catania et al. (2007) stellten fest, dass die CYP2B-Aktivität durch PB stärker induziert wurde, wenn gleichzeitig 0,1  $\mu\text{M}$  DEXA im Inkubationsmedium enthalten war. Meredith et al. (2003) beschrieben eine höhere CYP2B1-mRNA-Induktion durch PB bei Zusatz von ebenfalls 0,1  $\mu\text{M}$  DEXA zum Medium. Beide Autorengruppen arbeiteten zwar mit Leberschnitten männlicher Ratten unter anderen Bedingungen, die Befunde widersprechen aber nicht denen der eigenen Versuche. In einer ähnlichen Versuchsanordnung wie in der eigenen Arbeit war die CYP1A1-Induktion *in vitro* ebenfalls nicht durch gleichzeitige DEXA-Exposition gestört, sondern eher begünstigt worden (Reinhardt 2009).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die CYP2B1-Induktion durch simultanen Einsatz von DEXA, in niedriger und hoher Konzentration, und PB auf Enzymaktivitäts- und mRNA-Ebene gut demonstriert werden konnte. Beide DEXA-Konzentrationen störten oder maskierten die PB-abhängige CYP2B1-Induktion nicht. Mit Einsatz der hohen DEXA-Konzentration konnte die CYP2B1-Induktion auf Enzymaktivitätsebene sogar begünstigt werden. Damit sollte die gleichzeitige Exposition von Leberschnitten mit potentiellen CYP2B1- und 3A1-Induktoren das Auffinden der CYP2B-Induktionseigenschaft nicht behindern. Auch ein Zusatz von DEXA zum Inkubationsmedium zum Zweck der Stabilisierung wirkte sich nicht hinderlich aus.

### **6.3.2 PB-Exposition nach vorangegangener DEXA-Exposition *in vitro***

Im dritten Versuchsblock wurde ebenfalls das Ausmaß der *In-vitro*-CYP3A1-Induktion durch 0,01  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  DEXA mittels Messungen der 2 $\beta$ -TH-Aktivitäten nach 24- und 48-stündiger Schnittinkubation kontrolliert. Die Ergebnisse stimmten weitgehend mit denen anderer Versuche überein: Nach 24 Stunden DEXA-Exposition (horizontale Linien Abb. 5.10) wurden etwa die gleichen Aktivitäten gemessen wie bei den in Abb. 5.5 dargestellten Versuchen mit gleichzeitiger DEXA-PB-Exposition und wie in anderen vergleichbaren Studien (Glöckner et al. 2008, Reinhardt 2009, Demirdag 2010). Nach weiteren 24 Stunden Inkubation war die mit 1  $\mu\text{M}$  ausgelöste CYP3A1-Induktion weitgehend abgeklungen, was auch schon bei Reinhardt (2009) gezeigt worden war und in Einklang mit dem relativ schnellen Abklingen der DEXA-Wirkung nach *In-vivo*-Vorbehandlung steht.

Wie bei der In-vivo-Vorbehandlung hatte also die PB-Exposition begonnen, als sich CYP3A1 in induziertem Zustand befand (nach 1  $\mu\text{M}$  DEXA). Die relativ großen Standardfehler zeigen an, dass deutliche interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Präparationen auftraten. Diese können sowohl den CYP3A1-Expressionszustand als auch die allgemeine Vitalität der Schnitte betroffen haben, da ja die Inkubationsdauer mit 48 Stunden gegenüber den anderen Versuchen verdoppelt war. Mit steigender Inkubationsdauer ist mit zunehmenden hypoxischen Schäden zu rechnen, deren Ausmaß und Lokalisation von der Mikroumgebung bestimmt werden und im Einzelnen nicht vorhersagbar sind (Neupert et al. 2003).

Nach sukzessiver Schnittinkubation mit DEXA und PB waren die Absolutwerte von PROD und 16 $\beta$ -TH für beide DEXA-Konzentrationen denen nach simultanem Induktoreinsatz ähnlich. Allerdings waren die Umsätze deutlich geringer nach PB allein ohne DEXA. Dadurch entsteht der Eindruck, dass die CYP2B1-Induktion durch DEXA-Vorinkubation verstärkt wurde. Der geringere PB-Effekt (50  $\mu\text{M}$  PB allein) lässt sich damit erklären, dass die Induktorexposition erst begonnen wurde, als die Schnitte nach 24stündiger Inkubation schon in ihrer Funktion einer gewissen Veränderung (Adaptation an In-vitro-Bedingungen) unterlagen. Geringere Induzierbarkeit der CYP2B1-Aktivität bei PB-Zugabe mit Latenz war schon von Stahmann (2003) mit Leberschnitten männlicher Ratten gezeigt worden. Dass trotz dieser Latenz und der längeren Inkubationsdauer ähnliche Aktivitäten wie in den Simultanversuchen (vgl. Abb. 5.6 und Abb. 5.8) erreicht wurden, wenn DEXA vorher eingewirkt hatte, könnte verschiedene Ursachen haben. Einerseits könnte durch DEXA ein Funktionsverlust verhindert worden sein, wie dies bei Hepatozytenkulturen ausgenutzt wird (Silva et al. 1998). Andererseits könnte DEXA selbst die CYP2B1-Aktivität (indirekt) gesteigert haben, wie es sich in der Tendenz bei den Simultanversuchen angedeutet hatte, aber nun nur bei nachfolgender Einwirkung von PB erhalten blieb. Ersteres könnte vor allem für die niedrige DEXA-Konzentration zutreffen, die nicht selbst CYP2B-induzierend wirkt. Letzteres könnte für die höhere DEXA-Konzentration gelten. Dafür spricht die Tatsache, dass nach 1  $\mu\text{M}$  DEXA mit PB höhere Aktivitäten erreicht wurden als nach 0,01  $\mu\text{M}$  DEXA. Die hohen Induktionsfaktoren bei der PROD sollten nicht überbewertet werden, da die Bezugsgruppen (nach DEXA allein) hier eine besonders niedrige Aktivität aufwiesen, was nach 48stündiger Inkubation nicht ungewöhnlich ist. Auch in anderen Untersuchungen war ein gewisser Abfall der PROD schon nach 24stündiger Schnittinkubation gezeigt worden (Müller et al. 2000, Lerch 2008).



Immunhistochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben einen wachsenden Verlust lebensfähiger Zellen aufgrund einer mangelhaften Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen, wie oben bereits erwähnt wurde. Hauptsächlich innere Zellschichten wiesen nach prolongierten Inkubationszeiten über 24-48 Stunden koagulative Nekrosen auf (Lupp et al. 2001, Neupert et al. 2003). Diese Beobachtungen könnten den Aktivitätsrückgang in den Kontrollschnitten erklären. Dennoch sind die überlebenden adaptierten Zellen in der Lage, neben einer Stabilisierung unspezifischer Vitalitätszeichen (Protein-, Glutathion-,  $K^+$ - und DNA-Gehalt) differenzierte Leberfunktionen wie die Biotransformation bis 48 Stunden völlig aufrechtzuerhalten (Müller et al. 1998). Dieser Sachverhalt konnte auch in vorliegender Arbeit bestätigt werden.

Damit ist eine CYP2B1-Induktion durch PB in vitro auch nach vorangegangener DEXA-Exposition in vitro auf Enzymaktivitätsebene sicher nachweisbar. Vergleichbare Literaturbefunde liegen nicht vor. Die CYP2B1-Aktivität wurde durch PB in allen Gruppen nach DEXA zumindest tendenziell, z.T. auch signifikant, verbessert, was einen additiven oder potenzierenden Effekt auf die CYP2B1-Induktion vermuten lässt.

Wie auf Enzymaktivitätsebene war auch auf mRNA-Ebene eine CYP2B1-Induktion nachweisbar, und zwar in allen PB-exponierten Gruppen. Hierbei gab es aber gewisse Unterschiede zwischen den DEXA-Konzentrationen und zwischen den beiden jeweils untersuchten Stichproben. Nach 0,01  $\mu$ M DEXA wurden höhere absolute CYP2B1-mRNA-Gehalte gefunden als in allen anderen Versuchsreihen. Die Induktionsfaktoren differierten zwischen beiden Proben stark, da die Expression der Bezugsgruppen (nach DEXA allein) unterschiedlich ausgeprägt waren. Ob ein Zusammenhang zwischen einer sehr starken CYP2B1-mRNA-Erhöhung durch PB allein und einer geringeren Erhöhung durch DEXA allein (und umgekehrt) besteht, kann hier nur spekuliert werden. Auf alle Fälle scheint die induzierende PB-Wirkung durch die niedrige DEXA-Konzentration nicht beeinträchtigt, sondern eher verstärkt zu werden.

Nach 1  $\mu$ M DEXA wurden auffallend niedrige mRNA-Gehalte gemessen im Vergleich zu den Parallelgruppen ohne DEXA-Exposition. Jedoch lagen die absoluten Gehalte einer Stichprobe im gleichen Bereich wie bei den Simultanversuchen und nur bei der anderen Stichprobe tatsächlich niedriger. Die Induktionsfaktoren zwischen 3 und 5 waren zwar bei beiden Stichproben nicht sehr hoch, ließen aber eine abgelaufene Induktion trotzdem erkennen. Der relativ geringe PB-Effekt nach 1  $\mu$ M DEXA steht im Gegensatz zur stark in-

duzierten CYP2B1-Enzymaktivität. Mögliche Erklärungsansätze für die Diskrepanz der Ergebnisse sind bisher nur von spekulativem Charakter und bedürften der weiteren Abklärung. Grundsätzlich ist der Induktionsnachweis auf Ebene der CYP-mRNA sehr empfindlich und spiegelt schon kleinste Änderungen der Genexpression wider, während auf Enzymaktivitätsebene erst verzögert Veränderungen der Induktion sichtbar werden. Aus diesen Gründen könnte auf mRNA-Ebene frühzeitig eine Hemmung der CYP2B1-Induktion festgestellt werden, die sich auf Ebene der Enzymaktivität noch nicht vollzogen hat. Als mögliche Ursachen kommen zum einen der langsamere Abbau der CYP2B1-Proteine oder die stabilisierte Translation der selbigen in Frage sowie die starke CYP3A1-Induktion, die eine maximale CYP2B1-Induktion beeinträchtigen könnte. Durch die vorangegangene DEXA-Exposition könnte eine Verschiebung im CYP-Expressionsmuster stattgefunden haben, indem z.B. CYP3A1 auf Kosten anderer CYP erhöht wurde. Ein Ausgleich eines niedrigeren Expressionsniveaus auch von CYP2B1 mag in der verlängerten Inkubationszeit von 48 Stunden erschwert gewesen sein. Es ist aber auch zu bedenken, dass der mRNA-Gehalt allein keine Aussage über turnover-Raten und posttranskriptionelle Prozesse erlaubt. Auch Wechselwirkungen zwischen CAR und endogenen Liganden können eine Rolle spielen. Waxman et al (1999) postulierten, dass Steroide, wie Androstanol und Androstenol, mit CAR interagieren und dessen transkriptionelle Aktivität inhibieren. Durch Zusatz von PB und PB-artigen Induktoren wird die inhibierende Steroidwirkung aufgehoben (Waxman 1999). Ob DEXA auch diese Eigenschaft besitzt, ist nicht bekannt. Auch Wechselwirkungen zwischen verschiedenen nucleären Faktoren wie CAR und PXR mögen eine Rolle spielen. Pascussi et al. (2000) zeigten an humanen Hepatozyten, dass durch Einsatz von DEXA die CAR-mRNA-Expression gesteigert wurde und die PB-vermittelte Translokation von CAR in den Nucleus zunahm. Die exakten molekularen Mechanismen sind bisher nicht vollständig aufgeklärt und waren auch nicht Gegenstand vorliegender Arbeit.

Die Befunde der Sukzessivversuche spiegeln damit auf mRNA-Ebene die Prozesse, die bei In-vivo-Behandlung mit DEXA beobachtet wurden, bestenfalls qualitativ wider.

Insgesamt wurde festgestellt, dass die CYP2B1-Induktion nach sukzessivem Einsatz von DEXA, in niedriger und hoher Konzentration, und PB auf Enzymaktivitätsebene gut demonstriert werden konnte. Beide DEXA-Konzentrationen störten die PB-abhängige CYP2B1-Induktion nicht. Mit Einsatz der hohen DEXA-Konzentration konnte die CYP2B1-Induktion auf Enzymaktivitätsebene sogar begünstigt werden. Auch auf Ebene

der mRNA störte die niedrige DEXA-Konzentration die PB-abhängige CYP2B1-Induktion nicht. Erst die hohe DEXA-Konzentration beeinflusste die durch PB ausgelöste CYP2B1-Induktion, indem die Expression der CYP2B1-mRNA relativ gering ausfiel. Ein Induktionsnachweis zeichnete sich auf niedrigem Niveau dennoch ab.

#### **6.4 Ausblick auf die Nutzung von Präzisionsleberschnitten**

Weltweit werden jährlich eine Vielzahl an chemischen Substanzen und Pharmaka produziert, die mit Menschen in Berührung kommen. Die meisten dieser Fremdstoffe werden an verschiedenen CYP-Isoformen biotransformiert. Es kommt vor, dass mehrere Fremdstoffe am gleichen CYP metabolisiert werden und sich somit bezüglich ihrer Elimination beeinflussen können. Gefürchtet sind zu hohe Arzneimittelwirkspiegel im Patientenblut, die außerhalb der therapeutischen Breite liegen und oft mit unerwünschten Wirkungen einhergehen. Die präklinische Testung neuer Pharmaka ist demzufolge zwingend notwendig und erfordert die Entwicklung zuverlässiger In-vitro-Systeme, die der In-vivo-Situation nahe kommen sollten (Fretland und Monshouwer 2010). In der Literatur wurden Präzisionsleberschnitte als In-vitro-Modell zu Metabolismusstudien empfohlen (Gomez-Lechon et al. 2010, McKim 2010).

Langfristiges Ziel ist es das Modell „Präzisionsleberschnitt“ zu standardisieren und letztendlich menschliches Gewebe für In-vitro-Versuche zu verwenden. Das trägt dazu bei Tierversuche weiter zu reduzieren bzw. zu vermeiden und Speziesunterschiede von vornherein auszuschließen. Allerdings ist die Verfügbarkeit menschlichen Gewebes begrenzt, und starke Schwankungen in der Qualität der Proben kommen hinzu. Individuelle Unterschiede metabolischer Funktionen und mögliche Medikamentenvorbehandlungen sind nicht auszuschließen und können die Erhebung verlässlicher Ergebnisse einschränken. Stammen die Proben aus pathologisch verändertem Gewebe, können sie in ihren Eigenschaften stark voneinander abweichen. Daneben wirken sich unterschiedlich lange Transportwege und eine uneinheitliche Probenaufarbeitung auf die experimentellen Daten aus. Genannte Gründe zeigen auf, dass es weiterhin sinnvoll ist nötige Voruntersuchungen an tierischem Gewebe durchzuführen, um unter anderem zu klären, inwieweit eine Vorbehandlung des Gewebes mit Fremdstoffen nachfolgende Induktionsversuche in vitro beeinflusst.

Die vorgelegte Arbeit ist als Beitrag von Optimierungs- und Standardisierungsbestrebungen des Präzisionsleberschnittmodells einzuordnen. Die Ergebnisse eigener Untersuchung

---

belegen, dass sich auch DEXA-vorinduziertes Lebergewebe zu weiteren In-vitro-Untersuchungen, in diesem Fall einer CYP2B-Induktion mit dem Modellinduktor PB, verwenden lässt. Hinsichtlich der Nutzung humanen Materials zu Metabolismusstudien ist es denkbar, Schnitte menschlicher Leber zur Untersuchung der CYP2B-Induktion einzusetzen, auch nach erfolgter Exposition mit Glucocorticoiden.

## 7 Schlussfolgerungen

Anhand der Befunde vorliegender Studie lassen sich folgende Aussagen treffen:

1. Es konnte gezeigt werden, dass sich die verwendeten Präzisionsleberschnitte weiblicher Ratten gut zum Nachweis der CYP2B1-Induktion durch PB unter dem Einfluss des Modellinduktors DEXA eignen.
2. Die CYP2B1-Induktion in Präzisionsleberschnitten lässt sich prinzipiell auf Enzymaktivitätsebene und auf mRNA-Ebene nachweisen.
3. Die In-vitro-Testung potentieller CYP2B-Induktoren ist in Leberschnitten von CYP3A-induzierten Lebern nach DEXA in vivo uneingeschränkt möglich.
4. Die gleichzeitige Einwirkung von PB und DEXA in vitro wirkt sich nicht nachteilig auf die CYP2B-Induzierbarkeit von Rattenleberschnitten aus.
5. Die sukzessive Einwirkung von PB nach DEXA in vitro an Leberschnitten ist qualitativ mit der PB-Induktion an Schnitten DEXA-behandelter Ratten vergleichbar. Trotz Veränderung der CYP2B1-mRNA-Konzentrationen durch DEXA bleibt die Induzierbarkeit durch PB erhalten.
6. Hinsichtlich der Bestrebungen humanes Material für Metabolismusstudien zu nutzen, ist es denkbar, in weiterführenden Untersuchungen menschliche Leberschnitte zu CYP2B-Induktionsversuchen zu verwenden, auch dann, wenn der Patient, von dem das Gewebe stammte, einer Glucocorticoidexposition ausgesetzt war bzw. eine CYP3A-Induktion aufwies.

## 8 Literaturverzeichnis

- Adesnik M, Bar-Nun S, Maschio F, Zunich M, Lippman A, Bard E. 1981. Mechanism of induction of cytochrome P-450 by phenobarbital. *J Biol Chem*, 256 (20):10340-10345.
- Agrawal AK, Shapiro BH. 2003. Constitutive and inducible hepatic cytochrome P450 isoforms in senescent male and female rats and response to low-dose phenobarbital. *Drug Metab Dispos*, 31 (5):612-619.
- Audet-Walsh E, Anderson A. 2009. Dexamethasone induction of murine CYP2B genes requires the glucocorticoid receptor. *Drug Metab Dispos*, 37 (3):580-588.
- Bae SK, Cao S, Seo KA, Kim H, Kim MJ, Shon JH, Liu KH, Zhou HH, Shin JG. 2008. Cytochrome P450 2B6 catalyzes the formation of pharmacologically active sibutramine (N-{1-[1-(4-chlorophenyl)cyclobutyl]-3-methylbutyl}-N,N dimethylamine) metabolites in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, 36 (8):1679-1688.
- Baldwin SJ, Bramhall JL, Ashby CA, Yue L, Murdock PR, Hood SR, Ayrton AD, Clarke SE. 2006. Cytochrome P450 gene induction in rats ex vivo assessed by quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (TaqMan). *Drug Metab Dispos*, 34 (6):1063-1069.
- Bedi-Singh S, Einolf HJ, Gu H, Mangold JB, Fischer V. 2003. Correlation of cytochrome P450 mRNA induction (RT-PCR) and enzyme activity (LC-MS) in cultured human liver slices. *Drug Metabolism Reviews*, 35:127-127.
- Beigel J, Fella K, Kramer PJ, Kroeger M, Hewitt P. 2008. Genomics and proteomics analysis of cultured primary rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro*, 22 (1):171-181.
- Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, Fischer V, Gan L, Grimm S, Kao J, King SP, Miwa G, Ni L, Kumar G, McLeod J, Obach RS, Roberts S, Roe A, Shah A, Snikeris F, Sullivan JT, Tweedie D, Vega JM, Walsh J, Wrighton SA. 2003. The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective. *Drug Metab Dispos*, 31 (7):815-832.
- Boess F, Kamber M, Romer S, Gasser R, Muller D, Albertini S, Suter L. 2003. Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes, and liver slices

- compared to the in vivo liver gene expression in rats: possible implications for toxicogenomics use of in vitro systems. *Toxicol Sci*, 73 (2):386-402.
- Brandon EF, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH. 2003. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol*, 189 (3):233-246.
- Brodie BB, Axelrod J, Cooper JR, Gaudette L, La Du BN, Mitoma C, Udenfriend S. 1955. Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. *Science*, 121 (3147):603-604.
- Burczynski ME, McMillian M, Parker JB, Bryant S, Leone A, Grant ER, Thorne JM, Zhong Z, Zivin RA, Johnson MD. 2001. Cytochrome P450 induction in rat hepatocytes assessed by quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction and the RNA invasive cleavage assay. *Drug Metab Dispos*, 29 (9):1243-1250.
- Catania JR, McGarrigle BP, Rittenhouse-Olson K, Olson JR. 2007. Induction of CYP2B and CYP2E1 in precision-cut rat liver slices cultured in defined medium. *Toxicol In Vitro*, 21 (1):109-115.
- Code EL, Crespi CL, Penman BW, Gonzalez FJ, Chang TK, Waxman DJ. 1997. Human cytochrome P4502B6: interindividual hepatic expression, substrate specificity, and role in procarcinogen activation. *Drug Metab Dispos*, 25 (8):985-993.
- Conney AH. 1967. Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol Rev*, 19 (3):317-366.
- Cui X, Thomas A, Montgomery D, Gu C, Morrison RA, White RE, Cheng KC. 2005a. Rat PXR reporter-gene activity correlates with the induction of CYP3A in rat precision-cut liver slices. *Comb Chem High Throughput Screen*, 8 (4):341-346.
- Cui X, Thomas A, Han Y, Palamanda J, Montgomery D, White RE, Morrison RA, Cheng KC. 2005b. Quantitative PCR assay for cytochromes P450 2B and 3A induction in rat precision-cut liver slices: correlation study with induction in vivo. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 52 (2):234-243.
- Czekaj P. 2000. Phenobarbital-induced expression of cytochrome P450 genes. *Acta Biochim Pol*, 47 (4):1093-1105.

- Dail MB, Burgess SC, Meek EC, Wagner J, Baravik J, Chambers JE. 2007. Spatial distribution of CYP2B1/2 messenger RNA within the rat liver acinus following exposure to the inducers phenobarbital and dieldrin. *Toxicol Sci*, 99 (1):35-42.
- De Graaf IA, Van Meijeren CE, Pektas F, Koster HJ. 2002. Comparison of in vitro preparations for semi-quantitative prediction of in vivo drug metabolism. *Drug Metab Dispos*, 30 (10):1129-1136.
- de Kanter R, Monshouwer M, Meijer DK, Groothuis GM. 2002. Precision-cut organ slices as a tool to study toxicity and metabolism of xenobiotics with special reference to non-hepatic tissues. *Curr Drug Metab*, 3 (1):39-59.
- Demirdag T. 2010. Der Einfluss einer CYP1A1-Induktion durch Beta-Naphthoflavin auf die CYP3A1-Induzierbarkeit in vitro durch Dexamethason an Rattenleberschnitten [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Edwards DP. 1999. Coregulatory proteins in nuclear hormone receptor action. *Vitam Horm*, 55:165-218.
- Edwards RJ, Price RJ, Watts PS, Renwick AB, Tredger JM, Boobis AR, Lake BG. 2003. Induction of cytochrome P450 enzymes in cultured precision-cut human liver slices. *Drug Metab Dispos*, 31 (3):282-288.
- Ekins S. 1996. Past, present, and future applications of precision-cut liver slices for in vitro xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev*, 28 (4):591-623.
- Elaut G, Henkens T, Papeleu P, Snykers S, Vinken M, Vanhaecke T, Rogiers V. 2006. Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. *Curr Drug Metab*, 7 (6):629-660.
- Farkas D, Tannenbaum SR. 2005. In vitro methods to study chemically-induced hepatotoxicity: a literature review. *Curr Drug Metab*, 6 (2):111-125.
- Fisher RL, Hasal SJ, Sanuik JT, Gandolfi AJ, Brendel K. 1995. Determination of optimal incubation media and suitable slice diameters in precision-cut liver slices: Optimization of tissue slice culture .2. *Toxicol Methods*, 5 (2):115-130.
- Forman BM, Tzamelis I, Choi HS, Chen J, Simha D, Seol W, Evans RM, Moore DD. 1998. Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature*, 395 (6702):612-615.



- Forth W, Henschler D, Rummel W. 2005. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer, 9:47-57.
- Fretland A, Monshouwer M. 2010. Enzyme induction: translating multiple approaches, assays, endpoints, and opinions into a valuable induction screening strategy. *Comb Chem High Throughput Screen*, 13 (2):135-144.
- Gandolfi AJ, Wijeweera J, Brendel K. 1996. Use of precision-cut liver slices as an in vitro tool for evaluating liver function. *Toxicol Pathol*, 24 (1):58-61.
- Garfinkel D. 1958. Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys*, 77 (2):493-509.
- Gebhardt R, Hengstler JG, Müller D, Glöckner R, Buenning P, Laube B, Schmelzer E, Ullrich M, Utesch D, Hewitt N, Ringel M, Hilz BR, Bader A, Langsch A, Koose T, Burger HJ, Maas J, Oesch F. 2003. New hepatocyte in vitro systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures. *Drug Metab Rev*, 35 (2-3):145-213.
- Gerbal-Chaloin S, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Daujat M, Waechter F, Fabre JM, Carrere N, Maurel P. 2001. Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture. *Drug Metab Dispos*, 29 (3):242-251.
- Gibson GG, Skett P. 1994. Introduction to drug metabolism. Blackie Academic & Professional, London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, 2. Auflage.
- Glöckner R, Lieder A, Lupp A. 2008. Determination of CYP activity in precision-cut liver slices: whether to use intact slices or slice homogenate. *Anal Bioanal Chem*, 392 (6):1167-1172.
- Glöckner R, Rost M, Pissowotzki K, Müller D. 2001. Monooxygenation, conjugation and other functions in cryopreserved rat liver slices until 24 h after thawing. *Toxicology*, 161 (1-2):103-109.
- Glöckner R, Wagener J, Lieder A, Müller D. 2003. In vitro induction of cytochrome P4503A1-mRNA and testosterone hydroxylation in precision-cut liver slices from male and female rats. *Exp Toxicol Pathol*, 54 (5-6):411-415.

- Glöckner R, Steinmetzer P, Lupp A, Danz M, Müller D. 2002. In vitro induction of cytochrome P450 2B1- and 3A1-mRNA and enzyme immunostaining in cryopreserved precision-cut rat liver slices. *Toxicology*, 176 (3):187-193.
- Gokhale MS, Bunton TE, Zurlo J, Yager JD. 1997. Cytochrome P450 isoenzyme activities in cultured rat and mouse liver slices. *Xenobiotica*, 27 (4):341-355.
- Gomez-Lechon MJ, Lahoz A, Gombau L, Castell JV, Donato MT. 2010. In vitro evaluation of potential hepatotoxicity induced by drugs. *Curr Pharm Des*, 16 (17):1963-1977.
- Goodwin B, Moore LB, Stoltz CM, McKee DD, Kliewer SA. 2001. Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor. *Mol Pharmacol*, 60 (3):427-431.
- Guengerich FP, Dannan GA, Wright ST, Martin MV, Kaminsky LS. 1982. Purification and characterization of liver microsomal cytochromes p-450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or beta-naphthoflavone. *Biochemistry*, 21 (23):6019-6030.
- Handschin C, Meyer UA. 2003. Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev*, 55 (4):649-673.
- Hofmann MH, Bliedernicht JK, Klein K, Saussele T, Schaeffeler E, Schwab M, Zanger UM. 2008. Aberrant splicing caused by single nucleotide polymorphism c.516G>T [Q172H], a marker of CYP2B6\*6, is responsible for decreased expression and activity of CYP2B6 in liver. *J Pharmacol Exp Ther*, 325 (1):284-292.
- Honkakoski P, Negishi M. 2000. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J*, 347 (Pt 2):321-337.
- Honkakoski P, Moore R, Washburn KA, Negishi M. 1998. Activation by diverse xenochemicals of the 51-base pair phenobarbital-responsive enhancer module in the CYP2B10 gene. *Mol Pharmacol*, 53 (4):597-601.
- Kemper B. 1998. Regulation of cytochrome P450 gene transcription by phenobarbital. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 61:23-64.
- Klingenberg M. 1958. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 75 (2):376-386.

- Klinger W, Mueller, D. 1974. The influence of age on the protein concentration in serum, liver and kidney of rats determined by various methods. *Z Versuchstierk*, 16:149-153.
- Kocarek TA, Reddy AB. 1998. Negative regulation by dexamethasone of fluvastatin-inducible CYP2B expression in primary cultures of rat hepatocytes: Role of CYP3A. *Biochemical Pharmacology*, 55 (9):1435-1443.
- Kocarek TA, Schuetz EG, Guzelian PS. 1994. Biphasic regulation of cytochrome P450 2B1/2 mRNA expression by dexamethasone in primary cultures of adult rat hepatocytes maintained on matrigel. *Biochem Pharmacol*, 48 (9):1815-1822.
- Lake BG, Beamand JA, Japenga AC, Renwick A, Davies S, Price RJ. 1993. Induction of cytochrome P-450-dependent enzyme activities in cultured rat liver slices. *Food Chem Toxicol*, 31 (5):377-386.
- Lake BG, Charzat C, Tredger JM, Renwick AB, Beamand JA, Price RJ. 1996. Induction of cytochrome P450 isoenzymes in cultured precision-cut rat and human liver slices. *Xenobiotica*, 26 (3):297-306.
- Larsen MC, Brake PB, Parmar D, Jefcoate CR. 1994. The induction of five rat hepatic P450 cytochromes by phenobarbital and similarly acting compounds is regulated by a sexually dimorphic, dietary-dependent endocrine factor that is highly strain specific. *Arch Biochem Biophys*, 315 (1):24-34.
- Lerch C. 2008. Einfluss veränderter CYP2B1-Aktivität und -mRNA-Expression nach Induktion in vivo auf die nachfolgende Induzierbarkeit in vitro an Rattenleberschnitten [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Lerche-Langrand C, Toutain HJ. 2000. Precision-cut liver slices: characteristics and use for in vitro pharmaco-toxicology. *Toxicology*, 153 (1-3):221-253.
- Lewis DF, Sheridan G. 2001. Cytochromes P450, oxygen, and evolution. *Scientific World Journal*, 1:151-167.
- Lieder A. 2007. Veränderung der CYP3A-Expression und -Aktivität an Rattenleberschnitten nach Induktion in vivo und in vitro [Dissertation]. Jena: Friedrich Schiller-Universität.
- Lin JH. 2006. CYP induction-mediated drug interactions: in vitro assessment and clinical implications. *Pharm Res*, 23 (6):1089-1116.

- Lubet RA, Syi JL, Nelson JO, Nims RW. 1990. Induction of hepatic cytochrome P-450 mediated alkoxyresorufin O-dealkylase activities in different species by prototype P-450 inducers. *Chem Biol Interact*, 75 (3):325-339.
- Lubet RA, Mayer RT, Cameron JW, Nims RW, Burke MD, Wolff T, Guengerich FP. 1985. Dealkylation of pentoxyresorufin: a rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome(s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat. *Arch Biochem Biophys*, 238 (1):43-48.
- Lupp A, Danz M, Müller D. 2001. Morphology and cytochrome P450 isoforms expression in precision-cut rat liver slices. *Toxicology*, 161 (1-2):53-66.
- Lupp A, Glöckner R, Danz M, Müller D. 2002. Cryopreserved precision-cut rat liver slices: morphology and cytochrome P450 isoforms expression after prolonged incubation. *Toxicol In Vitro*, 16 (6):749-758.
- Lupp A, Glöckner R, Etzrodt J, Müller D. 2008. Precision-cut liver slices from rats of different ages: basal cytochrome P450-dependent monooxygenase activities and inducibility. *Anal Bioanal Chem*, 392 (6):1173-1184.
- Madan A, Dehaan R, Mudra D, Carroll K, Lecluyse E, Parkinson A. 1999. Effect of cryopreservation on cytochrome P-450 enzyme induction in cultured rat hepatocytes. *Drug Metab and Dispos*, 27 (3):327-335.
- Martignoni M, de Kanter R, Grossi P, Mahnke A, Saturno G, Monshouwer M. 2004. An in vivo and in vitro comparison of CYP induction in rat liver and intestine using slices and quantitative RT-PCR. *Chem Biol Interact*, 151 (1):1-11.
- Martin H, Sarsat JP, de Waziers I, Housset C, Ballardur P, Beaune P, Albaladejo V, Lerche-Langrand C. 2003. Induction of cytochrome P450 2B6 and 3A4 expression by phenobarbital and cyclophosphamide in cultured human liver slices. *Pharm Res*, 20 (4):557-568.
- McKim JM, Jr. 2010. Building a tiered approach to in vitro predictive toxicity screening: a focus on assays with in vivo relevance. *Comb Chem High Throughput Screen*, 13 (2):188-206.
- Meißner T. 1995. Der Einfluss von Dexamethason und Pregnenolon-16 $\alpha$ -carbonitril auf die Cytochrom-P450-abhängige Biotransformation bei Kombination mit RU 486 und STS 985 [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

- Mentzel T, Patzer L. 1990. Der Einfluss von Prostaglandin F 2a auf die Induktion des hepatischen Cytochrom-P450-Systems durch Phenobarbital und Betanaphtoflavon: Abhängigkeit der O-Dealkylaseaktivität vom Lebensalter (PEROD), der Induktordosis (EROD) und von dem Modulator Prostaglandin F 2a [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Meredith C, Scott MP, Renwick AB, Price RJ, Lake BG. 2003. Studies on the induction of rat hepatic CYP1A, CYP2B, CYP3A and CYP4A subfamily form mRNAs in vivo and in vitro using precision-cut rat liver slices. *Xenobiotica*, 33 (5):511-527.
- Meyer JS, Piper BJ, Vancollie VE. 2008. Development and characterization of a novel animal model of intermittent MDMA ("Ecstasy") exposure during adolescence. *Ann N Y Acad Sci*, 1139:151-163.
- Muangmoonchai R, Smirlis D, Wong SC, Edwards M, Phillips IR, Shephard EA. 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. *Biochem J*, 355 (Pt 1):71-78.
- Müller D. 1990. Influence of xenobiotics on drug metabolism and its sensitive detection. *Exp Pathol*, 39:187-194.
- Müller D, Glöckner R, Rost M, Steinmetzer P. 1998. Monooxygenation, cytochrome P450-mRNA expression and other functions in precision-cut rat liver slices. *Exp Toxicol Pathol*, 50 (4-6):507-513.
- Müller D, Steinmetzer P, Pissowotzki K, Glöckner R. 2000. Induction of cytochrome P450 2B1-mRNA and pentoxoresorufin O-depentylation after exposure of precision-cut rat liver slices to phenobarbital. *Toxicology*, 144 (1-3):93-97.
- Mullis K. 1986. *Specific Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction*.
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H, Schäfer-Korting M. 2001. Mutschler Arzneimittelwirkungen. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 8:21-35.
- Nebert DW, Gonzalez FJ. 1987. P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem*, 56:945-993.
- Nebert DW, Nelson DR, Feyereisen R. 1989. Evolution of the cytochrome P450 genes. *Xenobiotica*, 19 (10):1149-1160.

- Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, et al. 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol*, 12 (1):1-51.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6 (1):1-42.
- Neupert D, Glöckner R, Neupert G, Müller D. 2003. Ultrastructural changes in hepatocytes of precision-cut rat liver slices after incubation for 24 and 48 hours. *Exp Toxicol Pathol*, 54 (5-6):481-488.
- Nicholl DST. 1995. *Gentechnische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Oesch-Bartlomowicz B, Oesch F. 2008. Phosphorylation of xenobiotic-metabolizing cytochromes P450. *Anal Bioanal Chem*, 392 (6):1085-1092.
- Olinga P, Elferink MG, Draaisma AL, Merema MT, Castell JV, Perez G, Groothuis GM. 2008. Coordinated induction of drug transporters and phase I and II metabolism in human liver slices. *Eur J Pharm Sci*, 33 (4-5):380-389.
- Omura T, Sato R. 1962. A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem*, 237:1375-1376.
- Omura T, Sato R. 1964a. The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem*, 239:2370-2378.
- Omura T, Sato R. 1964b. The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties. *J Biol Chem*, 239:2379-2385.
- Padgham CR, Paine AJ. 1993. Altered expression of cytochrome P-450 mRNAs, and potentially of other transcripts encoding key hepatic functions, are triggered during the isolation of rat hepatocytes. *Biochem J*, 289 ( Pt 3):621-624.
- Paine AJ, Andreakos E. 2004. Activation of signalling pathways during hepatocyte isolation: relevance to toxicology in vitro. *Toxicol In Vitro*, 18 (2):187-193.

- Pan J, Xiang Q, Renwick AB, Price RJ, Ball SE, Kao J, Scatina JA, Lake BG. 2002. Use of a quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction method to study the induction of CYP1A, CYP2B and CYP4A forms in precision-cut rat liver slices. *Xenobiotica*, 32 (9):739-747.
- Parkinson A. 1996. An overview of current cytochrome P450 technology for assessing the safety and efficacy of new materials. *Toxicol Pathol*, 24 (1):45-57.
- Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ. 2000. Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: consequences on cytochrome P450 gene regulation. *Mol Pharmacol*, 58 (6):1441-1450.
- Pelkonen O, Turpeinen M, Uusitalo J, Rautio A, Raunio H. 2005. Prediction of drug metabolism and interactions on the basis of in vitro investigations. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 96 (3):167-175.
- Perkins EJ, Bao W, Guan X, Ang CY, Wolfinger RD, Chu TM, Meyer SA, Inouye LS. 2006. Comparison of transcriptional responses in liver tissue and primary hepatocyte cell cultures after exposure to hexahydro-1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5-triazine. *BMC Bioinformatics*, 7 Suppl 4:S22.
- Persson KP, Ekehed S, Otter C, Lutz ES, McPheat J, Masimirembwa CM, Andersson TB. 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. *Pharm Res*, 23 (1):56-69.
- Pohl RJ, Fouts JR. 1980. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal Biochem*, 107:150-155.
- Pustyl'nyak VO, Gulyaeva LF, Lyakhovich VV. 2005. CAR expression and inducibility of CYP2B genes in liver of rats treated with PB-like inducers. *Toxicology*, 216 (2-3):147-153.
- Rao MV, Rangarajan PN, Padmanaban G. 1990. Dexamethasone negatively regulates phenobarbitone-activated transcription but synergistically enhances cytoplasmic levels of cytochrome P-450b/e messenger RNA. *J Biol Chem*, 265 (10):5617-5622.

- Reinhardt M. 2009. Einfluss von Dexamethason auf die CYP1A1-Induktion in vitro durch den Modellinduktor Beta-Naphthoflavon (BNF) an Rattenleberschnitten [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Reuter S, Köhler B. 1991. Der Einfluss von Dexamethason und Prednisolon auf die postnatale Entwicklung der Cytochrom-P-450-abhängigen Biotransformation in der Rattenleber [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Ringel M, Oesch F, Gerl M, Klebach M, Quint M, Bader A, Bottger T, Hengstler JG. 2002. Permissive and suppressive effects of dexamethasone on enzyme induction in hepatocyte co-cultures. *Xenobiotica*, 32 (8):653-666.
- Ronis M, Ingelman-Sundberg M. 1998. Induction of human P450 enzymes: mechanisms and implications. In: Woolf T (ed) *A Handbook of Human Toxicology*, Marcel Decker, New York:239-262.
- Ronis MJ, Rowlands JC, Hakkak R, Badger TM. 1999. Altered expression and glucocorticoid-inducibility of hepatic CYP3A and CYP2B enzymes in male rats fed diets containing soy protein isolate. *J Nutr*, 129 (11):1958-1965.
- Sherratt AJ, Banet DE, Linder MW, Prough RA. 1989. Potentiation of 3-methylcholanthrene induction of rat hepatic cytochrome P450IA1 by dexamethasone in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, 249 (2):667-672.
- Shu L, Hollenberg PF. 1997. Alkylation of cellular macromolecules and target specificity of carcinogenic nitrosodialkylamines: metabolic activation by cytochromes P450 2B1 and 2E1. *Carcinogenesis*, 18 (4):801-810.
- Sidhu JS, Omiecinski CJ. 1995. Modulation of xenobiotic-inducible cytochrome P450 gene expression by dexamethasone in primary rat hepatocytes. *Pharmacogenetics*, 5 (1):24-36.
- Silva JM, Morin PE, Day SH, Kennedy BP, Payette P, Rushmore T, Yergey JA, NicollGriffith DA. 1998. Refinement of an in vitro cell model for cytochrome P450 induction. *Drug Metabolism and Disposition*, 26 (5):490-496.
- Smith PF, Gandolfi AJ, Krumdieck CL, Putnam CW, Zukoski CF, 3rd, Davis WM, Brendel K. 1985. Dynamic organ culture of precision liver slices for in vitro toxicology. *Life Sci*, 36 (14):1367-1375.



- Sonderfan AJ, Arlotto MP, Dutton DR, McMillen SK, Parkinson A. 1987. Regulation of testosterone hydroxylation by rat liver microsomal cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophys*, 255 (1):27-41.
- Stahmann N. 2003. In-vitro-Induktion der 7-Pentoxoresorufin-O-Depentylierung und von Cytochrom-P450-2B1-mRNA in Präzisionsleberschnitten Phenobarbital-vorbehandelter Ratten [Diplomarbeit]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät.
- Sueyoshi T, Negishi M. 2001. Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41:123-143.
- Truong NT, Moncion A, Barouki R, Beaune P, de Waziers I. 2005. Regulatory sequence responsible for insulin destabilization of cytochrome P450 2B1 (CYP2B1) mRNA. *Biochem J*, 388 (Pt 1):227-235.
- Wanke I, Schwarz M, Buchmann A. 2004. Insulin and dexamethasone inhibit TGF-beta-induced apoptosis of hepatoma cells upstream of the caspase activation cascade. *Toxicology*, 204 (2-3):141-154.
- Warburg O. 1923. Versuche an überlebendem Karzinomgewebe. *Biochem Z*, 142:317-333.
- Watkins PB, Wrighton SA, Schuetz EG, Maurel P, Guzelian PS. 1986. Macrolide antibiotics inhibit the degradation of the glucocorticoid-responsive cytochrome P-450p in rat hepatocytes in vivo and in primary monolayer culture. *J Biol Chem*, 261 (14):6264-6271.
- Waxman DJ. 1999. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys*, 369 (1):11-23.
- Waxman DJ, Azaroff L. 1992. Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem J*, 281 ( Pt 3):577-592.
- Waxman DJ, Dannan GA, Guengerich FP. 1985. Regulation of rat hepatic cytochrome P-450: age-dependent expression, hormonal imprinting, and xenobiotic inducibility of sex-specific isoenzymes. *Biochemistry*, 24 (16):4409-4417.
- Worboys PD, Carlile DJ. 2001. Implications and consequences of enzyme induction on preclinical and clinical drug development. *Xenobiotica*, 31 (8-9):539-556.

- 
- Wrighton SA, Ring BJ, VandenBranden M. 1995. The use of in vitro metabolism techniques in the planning and interpretation of drug safety studies. *Toxicol Pathol*, 23 (2):199-208.
- Yamada H, Ishii Y, Yamamoto M, Oguri K. 2006. Induction of the hepatic cytochrome P450 2B subfamily by xenobiotics: research history, evolutionary aspect, relation to tumorigenesis, and mechanism. *Curr Drug Metab*, 7 (4):397-409.
- Zukunft J, Lang T, Richter T, Hirsch-Ernst KI, Nussler AK, Klein K, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger UM. 2005. A natural CYP2B6 TATA box polymorphism (-82T--> C) leading to enhanced transcription and relocation of the transcriptional start site. *Mol Pharmacol*, 67 (5):1772-1782.

## 9 Anhang

### Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.1.....	31
Gelelektrophorese nach kompetitiver RT-PCR	
Abb. 5.1.....	32
PROD-Aktivität in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB in vitro	
Abb. 5.2.....	33
2 $\beta$ -TH-Aktivität in Leberschnitten DEXA-vorbehandelter Ratten (3 x 4 mg/kg KM) nach 24stündiger Inkubation mit PB in vitro	
Abb. 5.3.....	34
PROD- und 16 $\beta$ -TH-Aktivität in Leberschnitten DEXA-vorbehandelter Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB in vitro	
Abb. 5.4.....	35
CYP2B1-mRNA-Expression in Leberschnitten DEXA-vorbehandelter Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB in vitro	
Abb. 5.5.....	37
2 $\beta$ -TH-Aktivität in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24stündiger PB-Exposition ohne und mit gleichzeitiger DEXA-Exposition in vitro	
Abb. 5.6.....	38
PROD- und 16 $\beta$ -TH-Aktivität in Leberschnitten unbehandelter weiblicher Ratten nach 24stündiger PB-Exposition ohne (ungemusterte Säulen) und mit (karierte Säulen) gleichzeitiger DEXA-Exposition in vitro (0,01 $\mu$ M)	

---

Abb. 5.7.....	39
---------------	----

CYP2B1-mRNA-Expression in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB in vitro gleichzeitig mit 0,01  $\mu$ M DEXA

Abb. 5.8.....	40
---------------	----

PROD- und 16 $\beta$ -TH-Aktivität in Leberschnitten unbehandelter weiblicher Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB ohne (ungemusterte Säulen) und mit (karierte Säulen) gleichzeitiger DEXA-Exposition in vitro (1  $\mu$ M)

Abb. 5.9.....	41
---------------	----

CYP2B1-mRNA-Expression in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB in vitro gleichzeitig mit 1  $\mu$ M DEXA

Abb. 5.10.....	42
----------------	----

2 $\beta$ -TH-Aktivität in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB ohne (ungemusterte Säulen) und mit (karierte Säulen vorangegangener 24stündiger DEXA-Exposition in vitro (Serie mit 0,01  $\mu$ M DEXA = helle Säulen, mit 1  $\mu$ M DEXA = dunkle Säulen)

Abb. 5.11.....	43
----------------	----

PROD- und 16 $\beta$ -TH-Aktivität in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB ohne (ungemusterte Säulen) und mit (karierte Säulen) vorangegangener 24stündiger DEXA-Exposition in vitro; DEXA = 0,01  $\mu$ M

Abb. 5.12.....	44
----------------	----

CYP2B1-mRNA-Expression in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB in vitro im Anschluss an eine 24stündige Inkubation ohne oder mit 0,01  $\mu$ M DEXA

Abb. 5.13.....	45
----------------	----

PROD- und 16 $\beta$ -TH-Aktivität in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB ohne (ungemusterte Säulen) und mit (karierte Säulen) vorangegangener 24stündiger DEXA-Exposition in vitro; DEXA = 1  $\mu$ M

---

Abb. 5.14.....	46
----------------	----

CYP2B1-mRNA-Expression in Leberschnitten unbehandelter Ratten nach 24stündiger Inkubation mit PB in vitro im Anschluss an eine 24stündige Inkubation ohne oder mit 1  $\mu$ M DEXA

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 2.1.....	11
------------------	----

Induktoren und Modellreaktionen für CYP2B- und 3A-Isoenzyme (nach Parkinson 1996)

Tabelle 4.1.....	22
------------------	----

Zusammensetzung des Krebs-Henseleit (KH)-Puffers (Gebrauchslösung)

Tabelle 4.2.....	23
------------------	----

Versuchsanordnung

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau PD Dr. med. R. Glöckner für die Überlassung des Themas, die freundliche Unterstützung bei Planung und Auswertung der Versuche sowie bei der Arbeit am Manuskript bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. D. Müller für die inhaltlichen Hinweise und das fortwährende Interesse an dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt auch Frau Guder für die Geduld und Hilfe bei der praktischen Umsetzung der Versuchsreihen.

Bedanken möchte ich mich bei meinem Lebensgefährten und meiner Familie für Ihren Rückhalt und die mentale Unterstützung während meiner Arbeit an vorliegender Promotion.

---

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: (Frau PD Dr. R. Glöckner, Herr Prof. Dr. D. Müller),

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 22.11.2010

Stefanie Rohländer