

„Adaption an Fremdstoff- Exposition“

Mechanismus multi-generationaler Effekte nach Xenosensor-Aktivierung

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Karin Dietrich

geb. am 04.09.1986 in Frankfurt am Main

Mainz, den 28. September 2017

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2018

*„Das schönste Glück des denkenden Menschen ist,
das Erforschliche erforscht zu haben
und das Unerforschliche zu verehren.“*

Johann Wolfgang von Goethe

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 15. Juli 2013 bis zum 14. Juli 2016 am Institut für Pharmakologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt. Sie wurde finanziert durch ein Stipendium des Instituts für Molekulare Biologie (IMB) Mainz sowie durch eine Forschungsförderung der DFG (Nr. MA 6821/1-1).

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen sind die unmittelbare Fortsetzung des von Frau Dr. M. M. im Rahmen ihrer Promotion bearbeiteten Projekts. Sie erfolgten in Zusammenarbeit mit L. G. während ihrer Bachelorarbeit, T. G. und L. R. im Rahmen ihrer Masterarbeiten und U. G.-A.. Teile der beschriebenen Arbeiten (nachfolgend gekennzeichnet) wurden darüber hinaus von externen Kooperationspartnern am Translational Animal Research Center (TARC/Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz), am Molecular Imaging North Competence Center [MOIN CC] der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, am Institut für experimentelle Biomedizin des Universitätsklinikum Würzburg sowie am Institut für Molekulare Biologie [IMB] Mainz durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Weiterhin versichere ich, örtlich übernommene Ausführungen anderer Autoren und an Gedankengänge Anderer anlehrende eigene Formulierungen entsprechend gekennzeichnet und die Quellen zitiert zu haben.

Ort, Datum

Karin Dietrich

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	i
Inhaltsverzeichnis	ii
Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	viii
Zusammenfassung	ix
Abstract	xi
1 Einleitung	1
1.1 Anpassung an Umweltbedingungen	1
1.2 Fremdstoffmetabolismus und Biotransformation.....	2
1.3 CAR im Fremdstoffmetabolismus	5
1.4 CAR in endogenen Stoffwechselprozessen.....	9
1.5 Interindividuelle Variabilität in der Pharmakotherapie	13
1.6 Generationsübergreifende epigenetische Effekte	16
1.7 Generationsübergreifende Induktion von CAR Zielgenen.....	20
1.8 Zielsetzung.....	22
2 Material und Methode	24
2.1 Material	24
2.1.1 Puffer und Lösungen.....	24
2.1.2 Primer-Sequenzen	27
2.2 Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1 RNA-Extraktion	28
2.2.2 cDNA-Synthese.....	28
2.2.3 qPCR/TaqMan	29
2.2.4 Proteinextraktion und Quantifizierung mittels BCA	30
2.2.5 Protein-Fällung.....	30

2.2.6	SDS Page & Westernblot	30
2.2.7	ELISA.....	31
2.3	Tierversuche	32
2.3.1	Geschlechtsbestimmung	33
2.3.2	Zucht und Training von Zuchtböcken	34
2.3.3	Injektion von Mäusen zur Induktion des Lebermetabolismus.....	34
2.3.4	Töten und Entbluten von Mäusen.....	35
2.3.5	Blutzuckermessung und Glukosetoleranztest.....	36
2.3.6	Zoxazolamin-Paralyse-Versuch.....	37
2.3.7	Untersuchungen zur Übertragung durch die männliche Keimbahn.....	38
2.3.8	Embryotransfer und in-vitro Fertilisation	39
2.3.9	Untersuchungen zur Übertragung durch die Muttermilch.....	41
2.4	Biochemische Methoden	42
2.4.1	Analyse von Blut-Serum-Lipiden per HPLC-Größenausschluss- Chromatographie	42
2.4.2	Extraktion von TCPOBOP aus murinem Fettgewebe und Detektion mittels HPLC-MS	42
2.5	Radiologische Methoden / Molekulare Bildgebung	44
2.6	Statistische Analysen	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Validierung auf Proteinebene	46
3.2	Phänotypische Konsequenzen	47
3.2.1	Fremdstoffmetabolismus	47
3.2.2	Knochenhomöostase	48
3.2.3	Energiemetabolismus.....	56
3.3	Mechanismus der Übertragung	67
3.3.1	Untersuchungen zur Übertragung durch die männliche Keimbahn.....	67
3.3.2	Differenzierung zwischen prä- und postkonzeptioneller Exposition	68
3.3.3	Differenzierung zwischen prä- und postnataler Exposition	71

3.3.4	Induzierbarkeit verschiedener CAR-Zielgene durch TCPOBOP	73
3.3.5	Direkter Nachweis von TCPOBOP in murinem Fettgewebe	74
3.4	Erste Untersuchungen klinisch relevanter Induktoren.....	76
4	Diskussion	78
4.1	Nachhaltige und generationsübergreifende Beeinflussung der Kapazität des Fremdstoffmetabolismus nach CAR-Aktivierung	78
4.2	CAR-Aktivierung durch TCPOBOP führt zu osteoanabolen-Effekten.....	79
4.3	Generationsübergreifende positive Effekte auf Körpergewicht, Glukosetoleranz und Serumcholesterin nach CAR-Aktivierung.....	84
4.4	Die Transmission der CAR vermittelten Effekte geht auf die Übertragung von TCPOBOP durch die Muttermilch zurück	91
4.5	Erste Untersuchungen klinisch relevanter Induktoren zeigen keine generationsübergreifenden Effekte.....	95
4.6	Beurteilung des Risikopotentials anderer anthropogener Substanzen	97
4.7	Relevanz in Pharmakotherapie und Pharmakovigilanz.....	100
4.8	Generationsübergreifende Effekte als evolutionäres Bindeglied zwischen Adaption und Akklimatisation	102
	Literaturverzeichnis	103
A	Anhang	103
A1	Abkürzungsverzeichnis	122
A2	Programme, Online-Tools und Datenbanken.....	132
A3	Zusatzmaterial.....	133
B	Danksagung	145
C	Kongressbeiträge / Publikationen	147
D	Lebenslauf	148

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der modulären Struktur nukleärer Rezeptoren	7
Abb. 2: Schematische Darstellung des Dosierungsziels medikamentöser Therapie.....	13
Abb. 3: Unterscheidung multigenerationaler und transgenerationaler Effekte	17
Abb. 4: Anhaltende und Multigenerationale Induktion von Cyp2b10 nach TCPOBOP- Exposition	21
Abb. 5: Schematische Darstellung der murinen Spermatogenese und des experimentellen Designs zur Untersuchung aller Keimbahnstadien.....	38
Abb. 6: Struktur und hypothetische Resultate der in-vitro-Fertilisations- und Embryotransferexperimente.....	40
Abb. 7: Validierung der mRNA-Daten von Frau Dr. Marianne Mathäs auf Proteinebene mittels Westernblot	47
Abb. 8: Durch TCPOBOP Exposition ausgelöste Veränderungen in der Kapazität des Fremdstoffmetabolismus detektiert anhand der Zoxazolamin-Paralysedauer	48
Abb. 9: Radiologische Untersuchungen der vertebrealen Spongiosa TCPOBOP behandelte Tiere	49
Abb. 10: Radiologische Untersuchungen des kortikalen Knochens TCPOBOP behandelte Tiere	51
Abb. 11: Radiologische Untersuchungen von trabekulärem und kortikalem Knochen der Nachkommen TCPOBOP behandelte Tiere.....	53
Abb. 12: ELISA-basierte Konzentrationsbestimmung knochenspezifischer Marker im Blutserum TCPOBOP behandelte Tiere und ihrer Nachkommen.....	55
Abb. 13: Gewichtsentwicklung von TCPOBOP vorbehandelte Mäusen und ihren Nachkommen unter hoch-kalorischer Diät	57
Abb. 14: Absoluter Futterverbrauch TCPOBOP vorbehandelte Mäuse unter hoch-kalorischer Diät.....	58
Abb. 15: Basale Blutglukosemessungen TCPOBOP vorbehandelte Mäuse und ihrer Nachkommen	59

Abb. 16: Glukosetoleranztests (GTTs) TCPOBOP vorbehandelter Mäuse und ihrer Nachkommen.....	60
Abb. 17: Expressionsanalysen der Gluconeogenese-Schlüsselenzyme G6P (G6Pc) und PEPCK (Pck1) in der Leber von TCPOBOP vorbehandelten Mäusen und ihren Nachkommen	62
Abb. 18: Größenausschlusschromatographische Analyse der Serumcholesterolkonzentrationen TCPOBOP vorbehandelter Mäuse und ihrer Nachkommen.....	65
Abb. 19: Expressionsanalysen des HDL-Apolipoproteins Apoa1 in der Leber mit TCPOBOP vorbehandelter Mäuse und ihrer Nachkommen.....	66
Abb. 20: Induktions- und Transmissionspotential der verschiedenen Stadien der männlichen Gametogenese	68
Abb. 21: In-vitro-Fertilisations- (IVF) und Embryotransfer-Experimente (ET) zur Differenzierung zwischen prä- und postkonzeptioneller Übertragung der Cyp2b10 Induktion	71
Abb. 22: Fremdpflege-Experiment zur Differenzierung zwischen prä- und postnataler Übertragung der Cyp2b10 Induktion	72
Abb. 23: Induktion von Cyp2b10, Cyp3a11 und Cyp2c29 durch verschiedene Dosen TCPOBOP	74
Abb. 24: Detektion von TCPOBOP in murinem Fettgewebe mittels HPLC-MS/MS	76
Abb. 25: Cyp2b10-Expression in der Leber mit Phenobarbital oder Phenytoin vorbehandelter Mäuse und ihrer Nachkommen	77

Anhang

Abb. A 1: Geschlechtsbestimmung bei neugeborenen C57BL/6 Mäusen.....	135
Abb. A 2: Hepatische Cyp2b10-Expression nach Applikation von TCPOBOP in verschiedenen Lösungsmitteln.....	135
Abb. A 3: Schematische Darstellung des experimentellen Vorgehens bei einer in-vitro- Fertilisation	136
Abb. A 4: Bestimmung von Serumcholesterinen per HPLC- Größenausschlusschromatographie	137
Abb. A 5: Abdominale Fettmenge von TCPOBOP vorbehandelten Mäusen und ihren Nachkommen unter hoch-kalorischer Diät	137
Abb. A 6: Glukosetoleranztests (GTTs) TCPOBOP vorbehandelter Mäuse und ihrer Nachkommen – punktuelle Analysen des Blutglukosemaximums (30 min) und der Geschwindigkeit des stoffwechselvermittelten Rückgangs (60 min).....	139
Abb. A 7: Expressionsanalysen der Fettstoffwechsel-Regulatoren PPAR α und Srebf1 in der Leber mit TCPOBOP vorbehandelter Mäuse und ihrer Nachkommen.....	140
Abb. A 8: Vergleich der TCPOBOP-vermittelten unmittelbaren, anhaltenden und generationsübergreifenden Cyp2b10-Induktion in C57BL/6 und CD1 Mäusen.....	141
Abb. A 9: Nachweis von TCPOBOP in murinem Fettgewebe mittels HPLC-MS/MS (ohne Quantifizierung)	142
Abb. A 10: Hepatische Cyp2b10-Expression 4h und 24h nach Applikation von Carbamazepin	142
Abb. A 11: ELISA-basierte Konzentrationsbestimmung knochenspezifischer Marker im Blutserum TCPOBOP behandelte Tiere und ihrer Nachkommen nach 16-stündigem Fasten	143
Abb. A 12: Hepatische Cyp2b10-Expression 24h und 6 Wochen nach neonataler Applikation von Phenobarbital.....	144

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Puffer und Lösungen.....	24
Tab. 2: Primer & Sonden.....	27
Tab. 3: Zusammensetzung der qPCR-Ansätze für SYBR-Green und TaqMan® Experimente	29
Tab. 4: Verwendete kommerzielle ELISA-Systeme zur Analyse knochenspezifischer Serumparameter	32
Tab. 5: Zusammensetzung der PCR-Ansätze für die Multiplex-PCR zur Geschlechtsbestimmung.....	33
Tab. 6: Einstellungen des Agilent 6490 Triple Quadruple MS Systems	44
Tab. 7: Einstellungen des SCANCO vivaCT 80 für die Micro-CT-Scans von Tibien und Vertebrae.....	44
Tab. 8: Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse der radiologischen Untersuchungen	53
Tab. 9: Vergleich der Ammenqualitäten von C57BL/6 und CD1 Weibchen	69
Anhang	
Tab. A 1: Übersicht der Phänotypen von CAR bzw. PXR Einzel- und Doppel-KnockOuts sowie humanisierten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp	133
Tab. A 2: Gegenüberstellung der für Cyp2b10 mittels RNASeq, TaqMan und Westernblot ermittelten Genexpressionsänderungen.....	138
Tab. A 3: Induktionswerte von Cyp2b10, Cyp3a11 und Cyp2c29 in Abhängigkeit von der applizierten TCPOBOP Dosis	141
Tab. A 4: Erkennungssequenzen nukleärer Rezeptoren im erweiterten Promotorbereich (6 kb) der murinen Cytochrom P450 Isoformen 2b10, 3a11 und 2c29.....	144

Zusammenfassung

Eine wichtige Grundvoraussetzung für das Überleben ist die Fähigkeit zur Anpassung an dynamische Umweltfaktoren, welche eine unmittelbare Reaktion zur Aufrechterhaltung der Homöostase des endogenen Stoffwechsels erfordern. Einer dieser dynamischen Faktoren ist die Vielzahl der Fremdstoffe (Xenobiotika), denen jeder Organismus permanent ausgesetzt ist und welche potentiell gesundheitsbelastend oder toxisch sind. Um eine möglichst schnelle Ausscheidung schädlicher Substanzen zu gewährleisten werden Fremdstoffe beim Menschen und anderen Säugern durch die nukleären Rezeptoren CAR und PXR detektiert. Die Bindung von Xenobiotika an diese Rezeptoren aktiviert deren Aktivität als Transkriptionsfaktoren, wodurch die Expression von Enzymen und Transportern der Biotransformation in Leber und Dünndarm erheblich gesteigert wird. Diese Induktion ermöglicht die beschleunigte Metabolisierung und Exkretion von Fremdstoffen, beeinflusst jedoch auch diverse endogene Stoffwechselwege, da viele Metabolite wie Gallensäuren und Steroidhormone ebenfalls Zielstrukturen der Detoxifizierung sind.

Bislang ging man deshalb davon aus, dass die Induktion des Xenobiotikametabolismus reversibel und auf die Expositionszeit begrenzt ist, um Störungen des endogenen Stoffwechsels zu minimieren. Eine aktuelle Veröffentlichung und die der vorliegenden Arbeit vorangegangene Forschungstätigkeit der Arbeitsgruppe zeigten jedoch anhaltende und multigenerationale Expressionssteigerung von Cyp2b10 nach einmaliger Exposition gegenüber TCPOBOP – einem murinen CAR-Liganden. Nach Bestätigung der Induktion auf biologisch aktiver Proteinebene konnte in dieser Arbeit durch Zoxazolamin-Paralyseversuche nachgewiesen werden, dass diese Expressionssteigerung sowohl in exponierten Tieren als auch in der Folgegeneration den Fremdstoffmetabolismus anhaltend beeinflusst.

Um den endogenen Einfluss von CAR weiter zu charakterisieren, wurden im Verlauf dieser Arbeit auch Knochenhomöostase und Energiemetabolismus auf anhaltende und generationsübergreifende Effekte nach TCPOBOP Exposition untersucht. Mikro-CT-Untersuchungen von Tibien und Wirbelkörpern exponierter Tiere legten knochenanabole Prozesse nahe; parallele ELISA-Analysen von Serummarkern für Knochenauf- und -abbau bestätigten diese. Multigenerational waren jedoch keine strukturellen Unterschiede im Knochen zu erkennen. Lediglich die erhöhte Serumkonzentration des anabolen Markers und Osteoidbestandteils Osteocalcin konnte in beiden Generationen gezeigt werden.

Versuche mit hochkalorischer Ernährung bestätigten für exponierte Tiere – jedoch nicht für die Folgegeneration - die in der Literatur bereits mehrfach beschriebene Protektion vor Übergewicht. Glukosetoleranztests und Untersuchungen der Serum-Lipidzusammensetzung mittels HPLC-Größenausschlusschromatographie zeigten parallel anhaltend und

generationsübergreifend verbesserte Glukosetoleranz sowie reduzierte Konzentrationen von Gesamtcholesterin, HDL und LDL.

In Anbetracht der somit breit gefächerten Konsequenzen der persistierenden multigenerationalen Aktivierung von CAR, war es eine zentrale Zielsetzung der vorliegenden Arbeit den zugrundeliegenden Übertragungsmechanismus zu identifizieren. Nachdem Versuche eine Übertragung durch die männliche Keimbahn ausgeschlossen hatten, konnte mit Hilfe von in-vitro Fertilisationen und Embryotransferexperimenten zunächst nachgewiesen werden, dass die Transmission in der weiblichen Linie post-konzeptionell erfolgt und nicht auf epigenetische Veränderungen der Eizellen zurückzuführen ist. Ergänzend durchgeführte Fremdpflegeversuche belegten, dass die Übertragung der Induktion überwiegend während der Brutpflege durch den TCPOBOP-Transfer mit der Muttermilch und nur zu geringen Anteilen intra-uterin erfolgt.

Erste im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Tests zur Transmission klinisch genutzter Medikamente fielen negativ aus, da die verwendeten Pharmaka deutlich hydrophiler als TCPOBOP waren und entsprechend nicht im Fettgewebe akkumulieren konnten. Vergleichbare Effekte wie sie in den Tierversuchen mit TCPOBOP beobachtet wurden, sind dennoch auch beim Menschen durchaus vorstellbar, da zahlreiche in der Umwelt weit verbreitete Pestizide ähnliche physikochemische Stoffeigenschaften wie TCPOBOP aufweisen. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen somit nahe, dass persistierende lipophile Substanzen in der weiblichen Linie durch direkte Übertragung multigenerationale Effekte hervorrufen und die Gesundheit von Nachkommen auch bei Exposition lange vor der Schwangerschaft nachhaltig beeinflussen können. Entsprechend sollten Studien zur Risikobewertung lipophiler anthropogener Substanzen wie beispielsweise Pharmakovigilanzanalysen klinisch genutzter Wirkstoffe bei Frauen immer auch generationsübergreifende Untersuchungen einschließen.

Abstract

A basic requirement for survival is the ability of adaption to dynamic environmental factors which demand an immediate reaction to maintain the homeostasis of the endogenous metabolism. One of these dynamic factors is the variety of potentially deleterious or even toxic xenobiotics that each organism is exposed to permanently. To ensure that harmful substances get eliminated as quickly as possible, xenobiotics in humans and other mammals are detected by the nuclear receptors CAR and PXR. Binding to these receptors activates their activity as transcription factor which induces the expression of enzymes and transporters of the biotransformation in liver and small intestine. This induction allows the accelerated metabolization and excretion of xenobiotics but also influences various endogenous metabolic pathways as many metabolites such as bile acids and steroid hormones are target of the detoxification as well.

Up to now, it was assumed that the induction of the biotransformation is reversible and limited to the presence of xenobiotics to minimize disturbances of the endogenous metabolism. However, a recent publication and the previous research activities of our group showed persistent and multigenerational induction of Cyp2b10 after a single exposure to the murine CAR ligand TCPOBOP. Within the present work this induction was validated on biologically active protein level before it was demonstrated by means of zoxazolamine paralysis assays that the increase in expression influences the metabolism of xenobiotics both in exposed animals and in the subsequent generation.

To further characterize the endogenous influence of CAR, bone homeostasis and energy metabolism were analyzed regarding persistent and cross-generational effects after TCPOBOP exposure. Micro-CT studies of tibias and vertebral bodies of exposed animals suggested anabolic processes in bone which was confirmed by concurrent ELISA analyses of serum markers for bone buildup and degradation. Multigenerational no structural differences in bone were found though. Only the increased serum concentration of the anabolic marker and osteoid component osteocalcin could be demonstrated in both generations.

Experiments with high-fat-diet verified a protection against overweight as discussed in literature but only for exposed animals and not for the subsequent generation. Concurrent glucose tolerance tests and studies of the serum lipid composition by HPLC size exclusion chromatography showed persistently and cross-generationally improved glucose tolerance as well as reduced concentrations of total cholesterol, HDL and LDL.

Considering the wide-ranging consequences of the persistent multigenerational activation of CAR, it was a central objective of the present work to identify the underlying transmission mechanism. After experiments had excluded transmission through the male germ line, it was

possible to demonstrate by means of in vitro fertilization and embryo transfer that the transmission in the female line takes place post-conceptional and is not due to epigenetic changes in oocytes. Additional cross-fostering experiments proved transmission to be mediated predominantly via lactation and only to a minor part via intra-uterine exposure.

First tests regarding the transmission of clinically relevant drugs were negative as the drugs used were distinctly more hydrophilic than TCPOBOP and did not accumulate in lipophilic tissue therefore. However, effects comparable to those observed in animal experiments with TCPOBOP are also conceivable in humans, since numerous pesticides widely used in the environment have similar physicochemical properties as TCPOBOP. Thus, the results of this work suggest that persistent lipophilic substances can evoke multigenerational effects by direct transmission of the xenobiotic substance in the female line resulting in lasting effects on the health of offspring even if exposure took place long before pregnancy. Accordingly, examinations for risk assessment of lipophilic anthropogenic substances such as pharmacovigilance analyzes of clinically used drugs in women should always include cross-generational studies.

1 Einleitung

1.1 Anpassung an Umweltbedingungen

Für das Überleben wichtige Grundvoraussetzungen sind die Adaption von Individuen an die vorherrschenden Umweltbedingungen sowie ihre Fähigkeit zur Anpassung an dynamische Umweltfaktoren wie Klimabedingungen. Dabei gilt es die Adaptation, welche die Anpassung von Spezies im evolutionären Sinn durch natürliche Selektion beschreibt, von der Akklimatisation – der reversiblen Anpassung einzelner Individuen durch Veränderung in Physiologie, Biochemie oder Verhalten- zu unterscheiden (Wehner *et al.* 2007).

Adaption ist ein zentraler Faktor der Evolution. So werden im Laufe der Evolution zufällig aufgetretene Mutationen durch positive Selektion in einer Population angereichert, sofern sie die Angepasstheit verbessern und so Überlebens- und Fortpflanzungswahrscheinlichkeit erhöhen. Im Gegensatz dazu werden Mutationen, welche die Anpassung herabsetzen langfristig durch negative Selektionsprozesse eliminiert (Eckert *et al.* 2002).

Während Mutationen, die negativem Selektionsdruck unterliegen und somit eine eingeschränkte Fitness oder Reproduktivität begründen, häufig medizinisch relevant sind, hat in den vergangenen Jahren auch ein Paradebeispiel für positive Selektion einen großen medizinischen Stellenwert eingenommen; Lactose-Intoleranz begründet sich auf dem Verlust der Lactase Expression im Dünndarm und dem resultierenden Unvermögen Milchzucker zu verdauen, was bei erhöhtem Konsum zu gastrointestinalen Beschwerden wie Diarrhoe führt (Jobling *et al.* 2004). Trotzdem sie weithin als Krankheit betrachtet wird, ist Lactose-Intoleranz der physiologische Normalzustand, dem etwa 70% der Weltbevölkerung unterliegen. Die Lactase-Persistenz hingegen ist der mutante Phänotyp, welcher auf eine Punktmutation 14 kb vor dem Transkriptionsstart des Lactase-Gens in einer Transkriptionsfaktorbindestelle zurückzuführen ist und evolutiv mit dem kultur-historischen Beginn der Viehhaltung in Nord- und Zentraleuropa und bei Hirtenvölkern in Afrika und im mittleren Osten vor etwa 10.000 Jahren korreliert (Burger *et al.* 2007).

Einen Sonderfall medizinisch relevanter evolutionärer Adaptionen an die Umwelt bilden Merkmale, die balancierter Selektion unterliegen, was einer Förderung des heterozygoten Genotyps entspricht (Griffiths 2008). Das wohl bekannteste Beispiel ist die der Sichelzellanämie (Drepanozytose) zugrunde liegende Mutation der β -Kette des Hämoglobins (Allel Hb^S), welche heterozygot nachweislich einen protektiven Effekt gegenüber Malaria-Infektionen bietet, homozygot jedoch eine massive Schädigung der Erythrozyten und das Krankheitsbild der Sichelzellanämie bedingt (Jobling *et al.* 2004).

Während Adaptation somit sehr langsam über hunderte Generationen hinweg eine verbesserte Anpassung ermöglicht, erfordern einige Umweltfaktoren eine unmittelbare Reaktion des Individuums, um das Überleben zu sichern. Die dafür nötigen schnellen, reversiblen Veränderungen in Physiologie, Biochemie oder Verhalten werden - abgeleitet von den zahlreichen Prozessen der Thermoregulation - unter dem Begriff Akklimatisation zusammengefasst (Eckert *et al.* 2002). Während beispielsweise die Steigerung der Melanin-Synthese in der Haut bei erhöhter Sonneneinstrahlung einen Schutzmechanismus vor Zellschädigung darstellt, erlaubt die visuelle Adaption durch Anpassung der Pupillengröße die Aufrechterhaltung der Sinnesfunktion bei erheblichen Leuchtdichteunterschieden, wodurch es möglich ist sowohl am sonnendurchfluteten Strand als auch bei Mondschein zu lesen (Penzlin und Beinbrech 2009). Insbesondere der namensgebende Bereich der Thermoregulation umfasst zahlreiche gut erforschte Akklimatisationsmechanismen zur Aufrechterhaltung der Homöostase des endogenen Stoffwechsels, welche sich entweder auf Ebene des gesamten Tieres abspielen, aber auch einzelne Gewebe, Organe, Zellen oder sogar Zellkompartimente betreffen können (Eckert *et al.* 2002).

Ein weiterer hochgradig dynamischer Umweltfaktor ist das Spektrum der Fremdstoffe (Xenobiotika), denen jeder Organismus permanent ausgesetzt ist und die potentiell gesundheitsbelastend oder toxisch sind. Eine möglichst schnelle Ausscheidung der über Nahrung, Wasser, Atemluft oder Oberflächenkontakt aufgenommenen Fremdstoffe ist demnach essentiell zur Sicherung von homöostatischer Balance, Gesundheit und Fortpflanzungsfähigkeit (Willson und Kliewer 2002). Um dies zu gewährleisten, haben sich im Lauf der Evolution komplexe Anpassungsmechanismen, beruhend auf der konzertierten transkriptionellen Aktivität eines Genarsenals entwickelt, diese Xenobiotika zu metabolisieren und exkretieren (Chai *et al.* 2016).

1.2 Fremdstoffmetabolismus und Biotransformation

Der Begriff Xenobiotika umfasst all jene Substanzen, die nicht endogen im Körper vorkommen, was sowohl Toxine und Karzinogene natürlichen Ursprungs, Pflanzeninhaltsstoffe und Nahrungsbestandteile, aber auch Medikamente und Umweltgifte anthropogenen Ursprungs einschließt. Sie sind eine konstante Belastung für lebende Organismen (Marino *et al.* 2011), weil sie bei Akkumulation toxischer Konzentrationen Gesundheit und Fortpflanzungsfähigkeit gefährden (Klaassen *et al.* 2013). Da der Austausch mit der Umwelt z.B. durch Atmung oder Nahrungsaufnahme jedoch essentiell und somit die Exposition gegenüber Fremdstoffen unvermeidbar ist, bilden schnelle und effiziente Ausscheidung über Urin oder Fäzes den zentralen Schutzmechanismus des Körpers (Ashauer *et al.* 2012). Insbesondere lipophile Xenobiotika, welche im Gegensatz zu hydrophilen Substanzen gut resorbiert aber schlecht

eliminiert werden, da sie passiv durch Biomembranen diffundieren können (Handschin und Meyer 2003), bergen das Risiko im Körper zu akkumulieren. Um dem entgegen zu wirken, wird die Wasserlöslichkeit der meisten Fremdstoffe im Rahmen der Biotransformation erhöht, bevor die Exkretion durch spezifische Transporter gefördert wird (di Masi *et al.* 2009, Gao und Xie 2010). Neben Substanzen xenogenen Ursprungs sind auch einige endogene Metabolite wie z.B. Gallensäuren, die lipophil und potentiell toxisch sind, Zielstrukturen dieser bei Säugern primär in Leber und Dünndarm verlaufenden Detoxifizierung. Die Reaktionen der Biotransformation werden dabei nach einer von Williams 1959 begründeten Nomenklatur in Phase-I und Phase-II unterteilt (Doring und Petzinger 2014, Omiecinski *et al.* 2011b, Williams 1959).

Phase I der Biotransformation erhöht die Wasserlöslichkeit selbst nur geringfügig. Sie dient häufig eher der Funktionalisierung chemischer Verbindungen durch Bereitstellung funktioneller Gruppen, welche für die Konjugationsreaktionen der Phase II benötigt werden. Dies erfolgt durch energieaufwändige oxidative Reaktionen wie beispielsweise die Hydroxylierung von Doppelbindungen, Desaminierungen, Hydrierungen oder durch hydrolytische Spaltung von Estern und Amiden unter Verbrauch des Reduktionsäquivalents NADPH (di Masi *et al.* 2009, Handschin und Meyer 2003, Testa und Kramer 2006). Trotz der Beteiligung einiger Enzymsysteme, nimmt die Cytochrom-P450-Superfamilie mit ca. 80 % aller Phase-I-Reaktionen dabei eine zentrale Rolle ein (Heller 2013).

Cytochrom-P450-Enzyme (CYPs) sind Häm-abhängige Monooxygenasen, welche membrangebunden in den Mikrosomen des glatten endoplasmatischen Retikulums oder an der inneren Mitochondrienmembran insbesondere in Leber, Dünndarm und Nieren vorliegen und ein charakteristisches Absorptionsmaximum von 450 nm unter Kohlenmonoxid zeigen (Estabrook 2003). Vertreter der Cytochrom-P450-Superfamilie sind in nahezu allen Lebensformen vertreten, so dass inzwischen mehr als 11.000 einzelne CYPs entdeckt wurden. Dass sie auch im endogenen Stoffwechsel eine Vielzahl essentieller Funktionen erfüllen, zeigt sich nicht zuletzt an ihrer Beteiligung bei ca. 80 % aller oxidativen Prozesse in höheren Eukaryoten (Tralau und Luch 2013). In Mammalia finden sich 18 CYP-Familien, welche sich speziesabhängig aus unterschiedlich vielen Enzymen zusammensetzen. So enthält das humane Genom nur 57 funktionelle CYPs und 58 Pseudogene, während das murine Genom mit 102 funktionellen CYPs und 90 Pseudogenen beinahe doppelt so viele Loci aufweist (Chai *et al.* 2013, Tralau und Luch 2013). Das große Substratspektrum, welches insbesondere bei den CYPs des Fremdstoffmetabolismus der Familien CYP1, CYP2 und CYP3 auffällt und auf den evolutionären Druck, sich an möglichst viele externe Einflüsse anpassen zu können, zurückzuführen ist, umfasst unter anderem 50-75 % der medizinisch genutzten Wirkstoffe (Tralau und Luch 2013, Zanger und Schwab 2013). In diesem Zusammenhang besonders

bedeutsam sind die humanen Enzyme CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7, welche allein 30-50 % der hepatischen CYPs stellen, mindestens 40 % der eingesetzten Medikamente umsetzen und entsprechend häufig in Arzneimittelinteraktionen verwickelt sind (Daly 2006, di Masi *et al.* 2009, Hernandez *et al.* 2009, Koch *et al.* 2002, Wei *et al.* 2002, Wilkinson 2005, Willson und Kliewer 2002).

Die maßgebliche Erhöhung der Wasserlöslichkeit erfolgt in Phase II mittels Konjugation kleiner körpereigener Moleküle an die Substanzen bzw. Primärmetabolite aus Phase I (di Masi *et al.* 2009). Die im Zytoplasma verlaufenden Reaktionen werden in der Regel von Transferasen katalysiert, welche abhängig vom verwendeten Konjugat verschiedenen Superfamilien angehören (Klaassen *et al.* 2013, Omiecinski *et al.* 2011b). So gehören beispielsweise Transferasen, die Sulfonsäuregruppen übertragen, zu den Sulfotransferasen (SULTs / STs), solche, die die Konjugation von Glutathion katalysieren zu den Glutathion-S-Transferasen (GSTs), jene, die die Addition von Acetylgruppen vermitteln zu den N-Acetyltransferasen (NATs) und schließlich diejenigen, die die Glucuronidierungen auslösen zu den UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs) (Omiecinski *et al.* 2011b). Auf Grund der benötigten Konjugate sind Phase II Reaktionen häufig die kapazitätslimitierenden Schritte der Biotransformation.

1992 erweiterte Ishikawa die Nomenklatur von Williams um eine dritte Phase, die die Aktivität von Efflux-Transportern zur Förderung der hepatischen und renalen Exkretion über Galle und Urin umfasst (Ishikawa 1992). Eine zentrale Rolle nehmen hierbei die Mitglieder der ABC-Transporter-Superfamilie („ATP-binding-cassette“) ein, welche unter ATP-Verbrauch nicht nur Xenobiotika und deren Metabolite aus der Biotransformation, sondern auch zahlreiche endogene Substanzen wie Aminosäuren, Metallionen oder Zucker transportieren, die nicht passiv über die Phospholipidmembran diffundieren können. Die ABC-Superfamilie gliedert sich in 7 Familien bestehend aus insgesamt 49 Transporterproteinen, von denen 20 im Fremdstoff-Transport wirken und in der sinusoidalen oder apikalen Plasmamembran lokalisiert sind (Doring und Petzinger 2014, Marino *et al.* 2011). Der wohl prominenteste Vertreter der ABC-Transporter ist das nahezu ubiquitär exprimierte, 1976 entdeckte Permeabilitäts-Glykoprotein (P-gp; ABCB1), welches - neben seiner Beteiligung an Eliminationsprozessen in Leber und Niere – als zentraler Faktor der Blut-Gewebs-Schranken (Hirn, Hoden, Placenta) maßgeblich an der Protektion von Zentralem Nervensystem und Fortpflanzung beteiligt ist (Doring und Petzinger 2014). Da P-Glykoprotein jedoch darüber hinaus die Elimination antibiotischer und chemotherapeutischer Wirkstoffe in Bakterien und Tumorzellen bedingt und somit nachweislich an der Ausbildung von Resistenzen beteiligt ist, trägt es auch den Namen „Multidrug-Resistance-Protein 1“ (MDR1) (Kohle und Bock 2009, Omiecinski *et al.* 2011b). Andere ABC-Transporter, die eine Rolle bei Medikamenten-Resistenzen spielen, werden

hingegen ‚Multidrug resistance-associated proteins‘ (MRPs) genannt, wie beispielsweise ABCC2 (MRP2), welches polarere Liganden als P-gp hat und der wichtigste Transporter für Phase-II-Konjugate in der Leber ist (Doring und Petzinger 2014).

Eine zweite Erweiterung der Nomenklatur erfolgte schließlich 2006 durch Petzinger und Geyer, welche die Bedeutung von Transportern der sogenannten Phase 0 für die Aufnahme von Medikamenten aus dem Darmlumen in das Blut der Leberpfortader und aus dem Blut in die Hepatozyten der Leber beschrieben (Petzinger und Geyer 2006). Vermittelt durch Mitglieder der SLC-Transporter-Familien (‚Solute-Carrier‘) SLC21 (OATPs; ‚organic anion transporting family‘) und SLC22 (OATs/OCTs; ‚organic anion/cation transporting family‘) wird dabei eine Vielzahl endogener und exogener Substrate ATP-unabhängig über die Plasmamembranen transportiert (Doring und Petzinger 2014).

Die Anpassung des Fremdstoffmetabolismus erfolgt durch energieeffiziente Veränderung der Expression von Enzymen und Transportern der Phasen I bis III in Leber und Dünndarm abhängig von der vorherrschende Exposition (Mo und He 2014, Yan *et al.* 2015). Dabei vermitteln die Fremdstoffe selbst durch Aktivierung xenosensorischer Rezeptoren, welche nachfolgend als Transkriptionsfaktoren wirken, autoinduktiv die Prozesse der Detoxifizierung (Hoffmann und Partridge 2015, Timsit und Negishi 2007, Willson und Kliewer 2002). Die drei wichtigsten Xenosensoren und Schlüsselregulatoren der Biotransformation sind dabei der konstitutive Androstanrezeptor (CAR), der Pregnan-X-Rezeptor (PXR) und der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) (Mackowiak und Wang 2016, Omiecinski *et al.* 2011b). Während CAR und PXR nukleäre Rezeptoren der Familie NR1I sind, ist der AhR ein PAS-Domänen-Transkriptionsfaktor (di Masi *et al.* 2009, Mackowiak und Wang 2016). Alle drei Rezeptoren haben ein sehr breites Ligandenspektrum strukturell unterschiedlicher Substanzen (di Masi *et al.* 2009, Mo und He 2014), die keine offensichtlichen Gemeinsamkeiten haben, außer dass sie lipophil sind und relativ kleine Molekulargewichte haben (Handschin und Meyer 2003). Neben Fremdstoffen wie Pestiziden, Medikamenten oder Nahrungsbestandteilen erkennen sie dabei auch endogene Substanzen wie Steroidhormone oder Gallensäuren (di Masi *et al.* 2009, Stanley *et al.* 2006, Tolson und Wang 2010).

Im Folgenden konzentriert sich diese Arbeit weitestgehend auf den konstitutiven Androstanrezeptor (CAR), seine Zielgene, Liganden sowie die Mechanismen und Konsequenzen seiner Aktivierung.

1.3 CAR im Fremdstoffmetabolismus

Humanes CAR wurde erstmals 1994 unter dem Namen MB67 - abgeleitet von den Initialen der Forscherin Miriam Baes aus dem Labor von Dr. David Moore - als neuer hepatischer

nukleärer Rezeptor beschrieben (Baes *et al.* 1994, di Masi *et al.* 2009, Omiecinski *et al.* 2011b). Da bis heute neben den zahlreichen xenogenen und schwach affinen endogenen Liganden kein hoch-affiner endogener Ligand identifiziert werden konnte, zählt CAR genau wie PXR zur Gruppe der ‚adopted orphan receptors‘ (Kobayashi *et al.* 2015, Timsit und Negishi 2007). Seinen heutigen Namen trägt der Rezeptor auf Grund seiner hohen konstitutiven Aktivität und der Wechselwirkung mit Androstan-Metaboliten wie Androstanol oder 5 β -Pregnane-3,20-dione (di Masi *et al.* 2009, Forman *et al.* 1998, Moore *et al.* 2000).

Das humane NR1I3-Gen, welches CAR codiert, umfasst rund 8,5 kb, ist auf Chromosom 1 am Locus 1q23 zu finden und besteht aus 9 Exons und 8 Introns (di Masi *et al.* 2009, Germain und Bourguet 2013). Bislang sind 29 Splicevarianten (SV) von CAR bekannt, welche jedoch größtenteils zu funktionslosen Produkten oder Transkripten mit extrem niedrigen Expressionsleveln führen. Entsprechend gibt es nur vier natürlich vorkommende Varianten, die die Expression der Zielgene von CAR nachweislich beeinflussen (di Masi *et al.* 2009, Mathas *et al.* 2016, Swales und Negishi 2004). Zwei dieser Splicevarianten, die bis zu 50% der hepatischen CAR-Isoformen ausmachen, tragen kurze Insertionen in der Ligandenbindedomäne (LBD), welche einen Verlust der konstitutiven Aktivität sowie die Steigerung der Aktivierbarkeit durch Liganden bedingen (Arnold *et al.* 2004, Auerbach *et al.* 2003, Jinno *et al.* 2004, Omiecinski *et al.* 2011a, Omiecinski *et al.* 2011b, Scheer *et al.* 2008). Während die Aktivität der zweithäufigsten Variante SV2 (Insertion der Aminosäuren APYLT) dem Wildtyp (SV1) darüber hinaus sehr ähnlich scheint (Omiecinski *et al.* 2011a), zeigt die Isoform SV3 (Insertion der Aminosäuren SPTV) Unterschiede in der Ligandenspezifität. So bindet die SV3 im Gegensatz zu Wildtyp-CAR den Weichmacher DEHP (Di(2-ethylhexyl)phthalat) (DeKeyser *et al.* 2011), welcher zwischenzeitlich nahezu ubiquitär vorkommt, da bis zu 260 Millionen Pfund pro Jahr in der Produktion von Kunststoffprodukten wie z.B. medizinischen Venenkathetern verarbeitet werden (Hernandez *et al.* 2009).

Wie viele Enzyme und Transporter des Fremdstoffmetabolismus wird auch CAR insbesondere in Leber und Dünndarm stark exprimiert und somit in den Organen, die eine potentielle Eingangspforte für Xenobiotika in den Körper bilden (di Masi *et al.* 2009). Darüber hinaus findet sich schwächere Expression von CAR in nahezu allen Organen und Geweben (Chai *et al.* 2016, Nishimura *et al.* 2004). Strukturell folgt CAR dabei der für nukleäre Rezeptoren typischen modulären Proteinstruktur bestehend aus n-terminaler Aktivierungsfunktion (AF-1), DNA-Bindedomäne (DBD), Scharnierregion, Ligandenbindedomäne und c-terminaler AF-2-Domäne. (vgl. Abb. 1) (di Masi *et al.* 2009).



Abb. 1: Schematische Darstellung der modulären Struktur nukleärer Rezeptoren

Die Proteinstruktur nukleärer Rezeptoren gliedert sich in vier Domänen. N-Terminal befindet sich die ligandenunabhängige AF-1 Domäne gefolgt von der DNA-Bindedomäne (DBD), welche über eine Scharnierdomäne („Hinge“) mit der Ligandenbindedomäne (LBD) verbunden ist. C-Terminal ist die ligandenabhängige Aktivierungsfunktion (AF-2) lokalisiert.

Modifiziert nach (Handschin und Meyer 2003)

Die AF-Domänen nukleärer Rezeptoren dienen als Schnittstelle für Protein-Protein-Wechselwirkungen z.B. zur Rekrutierung von Cofaktoren (Omiecinski *et al.* 2011a). Die bei CAR stark verkürzte AF-2, wird durch einen kurzen Loop (Hx) in der aktiven Konformation stabilisiert, was die Bindung von Cofaktoren auch ohne vorherige Ligandenbindung ermöglicht und so die hohe basale Aktivität begründet (Mackowiak und Wang 2016, Omiecinski *et al.* 2011a). Eine dauerhafte Aktivierung der Zielgene wird durch Retention von CAR im Zytoplasma verhindert, welche auf die Bindung von CAR an einen Proteinkomplex bestehend aus HSP90 (heat shock protein 90), CCRP (cytoplasmic CAR retention protein), einer Untereinheit von PP-1 (Proteinphosphatase 1) und bislang unbekanntem weiteren Proteinen zurückzuführen ist (di Masi *et al.* 2009, Kobayashi *et al.* 2003, Sueyoshi *et al.* 2008, Yang und Wang 2014, Yoshinari *et al.* 2003). HSP70 (heat shock protein 70) stabilisiert den Multiproteinkomplex im Zytoplasma (Kobayashi *et al.* 2015, Timsit und Negishi 2014).

Ligandenbindung an der LBD resultiert in einer Konformationsänderung, was die Auflösung des Proteinkomplexes, die substanzvermittelte Rekrutierung der Protein-Phosphatase 2A (PP2A) und die anschließende Dephosphorylierung von CAR an den Aminosäuren Ser202 und Thr38 und somit die Translokation in den Zellkern ermöglicht (Hosseinpour *et al.* 2006, Wada *et al.* 2009, Yoshinari *et al.* 2003). Die Aufklärung dieses ersten Aktivierungsschrittes war lange problematisch, da sich CAR spontan im Zellkern transfizierter Zellen anreichert (Kawamoto *et al.* 1999), was einen massiven Rückgang der Induzierbarkeit im Vergleich zu primären Hepatozyten oder in vivo Experimenten zur Folge hat (Maglich *et al.* 2003, Mathas *et al.* 2012, Scheer *et al.* 2008). Darüber hinaus führt der Verlust der Retention im Zytoplasma dazu, dass die Wirkung der unter nukleären Rezeptoren einmaligen indirekten Aktivatoren von CAR nicht problemlos in vitro analysiert werden kann, da diese auf der Initiierung der Translokation beruht. Für die Modells substanz Phenobarbital (PB) konnte gezeigt werden, dass die indirekte Aktivierung von CAR auf eine Bindung von PB an den membrangebundenen EGFR (Epidermal growth factor receptor) zurückzuführen ist (Kawamoto *et al.* 1999, Kobayashi *et al.* 2015, Moore *et al.* 2000, Mutoh *et al.* 2013). Diese Interaktion verhindert die Wechselwirkung des EGFR mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und eine darauf normalerweise folgende Phosphorylierungskaskade, welche unter anderem die Dephosphorylierung von CAR reprimiert (Kobayashi *et al.* 2015, Osabe und Negishi 2011). Konsequenzen dieser Signalwegsunterbrechung sind darüber hinaus die Rekrutierung von

PP2A zum CAR-Proteinkomplex (Yang und Wang 2014) und die Ubiquitinierung und Degradierung von CCRP (Kobayashi *et al.* 2015), was die Translokation fördert. Neben Phenobarbital gehören auch die Medikamente Phenytoin und Paracetamol, das Biozid Triclosan, das Insektizid Chlordan und Bilirubin zur stetig wachsenden Gruppe indirekter CAR-Aktivatoren (Chai *et al.* 2016, di Masi *et al.* 2009, Huang *et al.* 2003, Omiecinski *et al.* 2011b).

Nach der Translokation in den Zellkern dimerisiert CAR mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR α), um im Folgenden als Heterodimer in den Promotorregionen der Zielgene zu binden (di Masi *et al.* 2009). Die beiden Zinkfinger motive der DNA-Bindedomäne (DBD) erkennen dabei spezifische Sequenzen (xenobiotic response elements), welche sich aus zwei je 6 bp langen repetitiven Sequenzen der idealisierten Konsensussequenz (AGGTCA) getrennt durch maximal 8 bp zusammensetzen. Abhängig von der Orientierung der repetitiven Sequenzen zueinander werden die Bindestellen direkte (DR), invertierte (IR) oder evertierte (ER), 'Repeats' genannt. Darüber hinaus beschreibt die Nomenklatur auch die Anzahl der Basen zwischen den Sequenzen, so dass die von CAR präferiert gebundenen DR4-Elemente (di Masi *et al.* 2009, Omiecinski *et al.* 2011a, Omiecinski *et al.* 2011b) direkte Sequenz-Wiederholungen getrennt durch 4 bp sind. Häufig finden sich die Erkennungssequenzen von CAR gruppiert in Enhancer Modulen, wie dem 'xenobiotic-responsive enhancer module' (XREM) oder dem 'phenobarbital-responsive enhancer module' (PBREM), welches rund 2 kb vor dem Transkriptionsstart (TSS) des humanen CYP2B6 bzw. des murinen Cyp2b10 liegt (Chai *et al.* 2016, Handschin und Meyer 2003, Mo und He 2014, Omiecinski *et al.* 2011b, Yan *et al.* 2015). Die Genexpression der CAR-Zielgene wird nach Bindung an die Promotorelemente letztlich durch die Rekrutierung von Cofaktoren geregelt. Die bekannten Coaktivatoren von CAR sind SRC-1 (Forman *et al.* 1998), PGC-1 α (Miao *et al.* 2006), SRC2/GRIP1/TIF2 (Kobayashi *et al.* 2015, Min *et al.* 2002), Sp1 (Muangmoonchai *et al.* 2001), ASC-2 (Choi *et al.* 2005), SMC1 (Inoue *et al.* 2006), CBP/p300 (Pascussi *et al.* 2008) und SRC3/pCIP/ACTR/AIB1/RAC-3/TRAM-1 (Kobayashi *et al.* 2015). Während Co-Repressoren wie NCoR, SMRT, SHP, DAX-1 (Kobayashi *et al.* 2015) Histondeacetylasen (HDACs) rekrutieren und so die Chromatinstruktur verdichten, vermitteln Coaktivatoren durch Rekrutierung von Histonacetyltransferasen (Spencer *et al.* 1997, Swales und Negishi 2004) sowie Methyltransferasen (Schurter *et al.* 2001) eine Auflockerung des Chromatins, wodurch der basale RNA-Polymerase-II-Transkriptionskomplex leichter binden kann (Pascussi *et al.* 2008). Einige der Cofaktoren von CAR wie beispielsweise SRC-1 zeigen sogar selbst histonmodifizierende Aktivität (Takizawa *et al.* 2010).

Da sowohl CAR als auch PXR DR3, DR4, DR5 und ER6 Elemente binden (Mackowiak und Wang 2016, Omiecinski *et al.* 2011b, Wei *et al.* 2002) teilen beide Rezeptoren eine große Anzahl an Zielgenen und Cofaktoren. Genomweite Analysen zeigen, dass CYP2B6, CYP3A4

und CYP2C9 des Menschen genauso wie Cyp3a11, Cyp2b10 und Cyp2c37 der Maus der Regulation beider Xenosensoren unterliegen (Aleksunes und Klaassen 2012, Cui und Klaassen 2016, Tojima *et al.* 2012). Darüber hinaus überschneiden sich auch die Ligandenspezifitäten von CAR und PXR (Orans *et al.* 2005), was eine Erhöhung der Körperreaktion auf potentielle Toxizität sowie eine partielle Kompensation bei Ausfall oder Fehlfunktion des Partners ermöglicht (di Masi *et al.* 2009, Handschin und Meyer 2003). Da jedoch weder bei den Zielgenen noch im Ligandenspektrum eine vollständige Überschneidung vorliegt, handelt es sich nicht um eine funktionelle Redundanz; vielmehr haben CAR und PXR sich ergänzende Rollen im Fremdstoffmetabolismus.

Während Orthologe nukleärer Rezeptoren zwischen Mensch und Maus normalerweise eine Aminosäure-Homologie von 85 - 95 % in DBD und LBD aufweisen, fallen die Ligandenbindedomänen von CAR und PXR durch ihre mit 70 % sehr niedrige Interspezies-Homologie auf (di Masi *et al.* 2009, Germain und Bourguet 2013). Diese Divergenz, welche wie Sequenzanalysen zeigen durch Selektion gefördert wird (Omiecinski *et al.* 2011b), führt dazu, dass CAR Orthologe wie humanes CAR (hCAR) und murines CAR (mCAR) sich zwar strukturell stark ähneln, dennoch aber deutliche Unterschiede im Ligandenspektrum aufweisen (Choi *et al.* 1997). Durch ihre Bindung an die LBD unterliegen direkte Liganden häufiger einer Spezies-Selektivität, wohingegen indirekte Aktivatoren seltener betroffen sind (Mackowiak und Wang 2016). So aktiviert Phenobarbital beispielsweise sowohl humanes als auch murines CAR, wohingegen der direkte hCAR-Ligand CITCO (6-(4-Chlorophenyl)imidazol[2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehyde O-(3,4-dichlorobenzyl)oxime) (Kobayashi *et al.* 2015, Maglich *et al.* 2003) keinen Effekt in Mäusen zeigt. Umgekehrt hat auch der sehr potente mCAR-Modellligand TCPOBOP (1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]-benzen) (Poland *et al.* 1980, Tzameli *et al.* 2000) keine humane Wirkung.

1.4 CAR in endogenen Stoffwechselprozessen

Oft liefern Knock-out (KO) Modelle gute Hinweise hinsichtlich des Einflusses einzelner Gene auf das gesamte endogene System. CAR KO-Mäuse zeigen allerdings keinen offensichtlichen Phänotyp, haben eine normale Lebenserwartung und sind fruchtbar. Genauere Untersuchungen offenbaren jedoch deutliche Abweichungen in Xenobiotika und Endotoxin-Sensitivität (vgl. A3 Tab. A 1) (Swales und Negishi 2004, Xie 2009). So sind sie beispielsweise empfindlich gegenüber Hyperbilirubinämie und Gallensäure vermittelter Hepatoxizität. Bezüglich Bilirubin beruht der protektive Effekt von CAR auf der Induktion der Glucuronidierung von Bilirubin durch UGT1A1 und des MRP2-vermitteltem Transports in die Galle. Entsprechend ermöglicht CAR die Therapie von Gelbsucht durch Aktivatoren wie Phenobarbital (Chai *et al.* 2016, di Masi *et al.* 2009, Huang *et al.* 2003, Tien *et al.* 2007) oder

6,7-Dimethylesculetin, welches ein Inhaltsstoff des bei neonataler Gelbsucht verabreichten ‚Yin Chen‘ Tee der chinesischen Medizin ist (Omiecinski *et al.* 2011b). Der Schutz vor Hepatotoxizität hingegen, welche durch die Akkumulation von Gallensäuren (di Masi *et al.* 2009) ausgelöst wird, wird durch Induktion von CYP3A11, SULT2A1 und MRP3 vermittelt (Chai *et al.* 2016). Passend dazu konnte in Mäusen nach viertägiger Behandlung mit TCPOBOP eine Verringerung der hepatischen Gallensäuren und ein erhöhter Gallenfluss detektiert werden (Lickteig *et al.* 2016). CAR wirkt darüber hinaus regenerationsfördernd nach Leber-Verletzungen (Hernandez *et al.* 2009, Kobayashi *et al.* 2015) und vermittelt hepatoprotektive Effekte gegenüber oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) und alkohol-induzierter Leberschädigung mittels Erhöhung der Expression von Superoxid-Dismutase (SOD-3) und alkohol-metabolisierenden Enzymen (Kobayashi *et al.* 2015).

Des Weiteren kann eine Beteiligung von CAR am Knochenmetabolismus angenommen werden, da sowohl für einen humanen CAR-Polymorphismus (Urano *et al.* 2009) als auch für männliche CAR-KO-Mäuse (Cho *et al.* 2014) eine Erhöhung der Knochenmineraldichte (bone mineral density, BMD) gezeigt werden konnte. Im Mausmodell wurde der Effekt auf erhöhte Serumkonzentrationen des osteoanabolen Sexualhormons Testosteron zurückgeführt, welche sich über die in KO-Mäusen reduzierte hepatische Expression der testosteron-metabolisierenden Enzyme Cyp2b9 und Cyp2b10 erklärt (Guo *et al.* 2007, Notelovitz 2002, Vico und Vanacker 2010). Eine Induktion des Testosteron-Metabolismus durch CAR-Aktivierung könnte somit eine Reduktion der BMD hervorrufen. Passend zu dieser Hypothese zeigen Mäuse und Ratten nach fünfwöchiger täglicher Behandlung mit dem spezifischen CAR-Aktivator Phenytoin (Jackson *et al.* 2006) eine Verringerung der BMD um 7-9% (Anwar *et al.* 2014a, Anwar *et al.* 2014b, Onodera *et al.* 2001). Auch beim Menschen wird die Langzeittherapie mit CAR-aktivierenden Medikamenten wie den Antikonvulsiva Phenobarbital, Phenytoin oder Carbamazepin mit einer Verringerung der Knochenmineraldichte und assoziierten Erkrankungen wie Osteoporose in Verbindung gebracht (Lee *et al.* 2010, Meier und Kraenzlin 2011, Pack und Morrell 2004). Allerdings wird dies häufig einem gesteigerten Katabolismus von Vitamin D, gefolgt von Hypokalzämie und sekundärem Hyperparathyreoidismus zugeschrieben, welcher Knochenresorption zur Freisetzung von Kalzium hervorruft (Fitzpatrick 2004, Hernandez *et al.* 2009, Khanna *et al.* 2009).

Auch der Hormonhaushalt steht in Verbindung zu CAR. So sind einige Steroidhormone Agonisten (Estron und Estradiol) (Omiecinski *et al.* 2011a, Swales und Negishi 2004) oder inverse Agonisten von CAR (Androstenol, Progesteron und Testosteron) (di Masi *et al.* 2009, Handschin und Meyer 2003, Omiecinski *et al.* 2011a) und werden durch geschlechtsspezifisch regulierte Zielgene wie CYP3A4, CYP2A4 oder UGT1A1 metabolisiert (Beierle *et al.* 1999,

Ledda-Columbano *et al.* 2003, Wei *et al.* 2002). Testosteron und seine zahlreichen Metabolite werden sogar als Biomarker für CYP-Aktivität genutzt (Buratti *et al.* 2011, Canistro *et al.* 2009, Di Consiglio *et al.* 2009). Obendrein unterliegt das Schilddrüsenhormon T4 ebenfalls CAR-regulierten Konjugationsreaktionen (UGT1A1 & SULT1A1) (di Masi *et al.* 2009, Tien *et al.* 2007), was beispielsweise unter chronischer Behandlung mit antikonvulsiven Medikamenten oder bei chronischer PCB-Exposition (Polychlorierte Biphenyle) eine kompensatorische Schilddrüsenhypertrophie hervorrufen kann (Hernandez *et al.* 2009, Pascussi *et al.* 2008).

Energiestoffwechsel und CAR-vermittelte Detoxifizierung wiederum unterliegen einer wechselseitigen Beeinflussung. So führen Erkrankungen wie Adipositas oder Lebersteatose proportional der hepatischen Fettakkumulation zu einer Einschränkung der Kapazität des Xenobiotika-Metabolismus, da freie Fettsäuren inhibierend auf CAR wirken (Gao und Xie 2010). Insulinmangel hingegen, wie er bei Diabetes Typ 1 auftritt, bedingt eine beschleunigte Biotransformation, welche durch Insulin-Substitution normalisiert werden kann (Ding *et al.* 2006, Gao und Xie 2010). Die den hepatischen Medikamentenstoffwechsel repremierenden Effekte von Insulin sind dabei auf den Kern-Export von FoxO1 (forhead box protein O1) zurückzuführen, welches ein zentraler Regulator der Gluconeogenese und ein Coaktivator von CAR ist (Gao und Xie 2010, Kodama *et al.* 2004, Yasujima *et al.* 2016). Dies zeigt sich auch in der verlangsamten Fremdstoffmetabolisierung insulinpflichtiger Diabetiker (Lahtela *et al.* 1985).

Umgekehrt beeinflusst die Aktivierung von CAR auch den Energiehaushalt der Leber entscheidend (Kobayashi *et al.* 2015, Ma *et al.* 2008, Moreau *et al.* 2008, Wada *et al.* 2009). Beispielsweise reduzieren TCPOBOP oder Phenobarbital sowohl in Mäusen unter hochkalorischer Diät als auch in diabetischen Ratten die Blutglukose und verbessern Insulinsensitivität und Glukosetoleranz (Dong *et al.* 2009b, Gao *et al.* 2009, Mo und He 2014, Venkatesan *et al.* 1994, Yasujima *et al.* 2016). Derartige Effekte auf den Glukosehaushalt, wie sie auch bei der Behandlung von Diabetikern mit Phenobarbital auftreten (Lahtela *et al.* 1985), werden im allgemeinen auf eine Hemmung der Gluconeogenese, vermittelt durch die verminderte Expression der Schlüsselenzyme Glukose-6-phosphatase (G6P) und Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK), zurückgeführt (Dong *et al.* 2009b, Lynch *et al.* 2014, Miao *et al.* 2006, Rezen *et al.* 2009, Ueda *et al.* 2002). Die transkriptionelle Inhibition wiederum begründet sich in der Konkurrenz um Cofaktoren und DNA-Bindestellen zwischen CAR und den die Gluconeogenese regulierenden Transkriptionsfaktoren HNF4 α („hepatocyte nuclear factor 4 alpha“) und FoxO1 („Sequestration Effect“) (Gao und Xie 2010, Kobayashi *et al.* 2015, Miao *et al.* 2006) sowie in der Induktion von Sult2b1b, welches die Translokation von HNF4 α in den Zellkern durch Deacetylierung verhindert (Wada *et al.* 2009, Yan *et al.* 2015). Die CAR-vermittelten Effekte auf Lipogenese und Cholesterinmetabolismus hingegen divergieren zwischen Tiermodell und menschlichem System (Chai *et al.* 2016). Während

human die Therapie mit antikonvulsiven Medikamenten wie Phenobarbital, Carbamazepin oder Phenytoin erhöhte Cholesterolvere, Lipoproteinlevel und vereinzelt sogar Lebersteatose nach sich zieht (Chai *et al.* 2016, Grieco *et al.* 2005, Loscher *et al.* 1993, Pascussi *et al.* 2008), hat die CAR-Aktivierung in Mäusen einen positiven Einfluss auf die Serumlipidzusammensetzung. Sie resultiert in der Reduktion von Fettmasse und Körpergewicht (Masson *et al.* 2008, Rezen *et al.* 2009) sowie in der Abnahme von Total- (Kobayashi *et al.* 2015), LDL- (Rezen *et al.* 2009) und HDL-Cholesterin (Chai *et al.* 2016, Masson *et al.* 2008) und wirkt darüber hinaus sogar protektiv hinsichtlich der Folgen einer hochkalorischen Diät (Chai *et al.* 2016, Dong *et al.* 2009b, Gao *et al.* 2009, Masuyama und Hiramatsu 2012, Yang und Wang 2014). Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen sind bislang unklar, doch es wurde eine erhöhte Ausscheidung von Gallensalzen (Yan *et al.* 2015) diagnostiziert. Des Weiteren konnten einige Proteine im Fettstoffwechsel identifiziert werden, deren Expression durch Aktivierung von CAR reprimiert wird (Loscher *et al.* 1993, Mo und He 2014, Wada *et al.* 2009). Dies betrifft neben dem Apolipoprotein von HDL (Apoa1) (Masson *et al.* 2008, Rezen *et al.* 2009, Yan *et al.* 2015) auch zentrale Regulatoren des Fettstoffwechsels wie den Transkriptionsfaktor Srebf1 (sterol regulatory element-binding protein 1) (Lynch *et al.* 2014, Zhai *et al.* 2010) und die nukleären Rezeptoren Ppar α (peroxisome proliferator activated receptor alpha) (Maglich *et al.* 2009, Rezen *et al.* 2009) und Ppar γ (peroxisome proliferator activated receptor gamma) (Rezen *et al.* 2009). Vergleichbar mit der transkriptionellen Inhibition in der Gluconeogenese könnten auch hier Squelching-Effekte zwischen CAR und anderen nukleären Rezeptoren wie HNF4 α , LXR (liver X receptor) oder FXR (farnesoid X receptor) eine Rolle spielen.

Welche massiven Folgen eine Störung der durch CAR beeinflussten Stoffwechselwege haben kann, zeigt sich nicht zuletzt in der bei Nagern beobachteten Leberkrebs- (HCC – hepatocellular carcinoma) und Leberzell-Adenoma-Bildung nach TCPOBOP oder Phenobarbital-Behandlung (Thomson *et al.* 2014). Die Ursachen dieser nicht-genotoxischen Karzinogenese sind bislang nicht vollständig geklärt, jedoch konnte eine CAR-vermittelte proliferationsfördernde, antiapoptotische Störung der Normalexpression von GADD45B (Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta), Mdm2 (Mouse double minute 2 homolog) und FoxM1 (Forkhead box protein M1) ausgemacht werden (Omiecinski *et al.* 2011b). Beim Menschen hingegen ist die Karzinogenität von CAR-Aktivatoren umstritten, da auch große retrospektive Studien zu den Langzeiteffekten von Phenobarbital-Therapien keinen Anstieg der HCC-Inzidenz zeigen, diesen allerdings auch nicht ausschließen können (Braeuning *et al.* 2014, Kobayashi *et al.* 2015, Kohle *et al.* 2008, Omiecinski *et al.* 2011a). Vorstellbar wäre eine geringere Sensitivität nachdem humanisierte Mäuse zwar noch Fälle von PB-induzierter HCC zeigen – jedoch in signifikant geringerem Ausmaß (Braeuning *et al.* 2014, Kobayashi *et al.* 2015).

Die zahlreichen CAR-vermittelten Effekte im endogenen Metabolismus zeigen wie weitreichend die Konsequenzen einer Aktivierung beispielsweise durch eine medikamentöse Therapie sein können.

1.5 Interindividuelle Variabilität in der Pharmakotherapie

Da nur sehr wenige Medikamente direkt exkretiert werden (Honkakoski *et al.* 2003), spielt der Fremdstoffmetabolismus eine zentrale Rolle in der Pharmakotherapie. Die Dosis von Medikamenten wird entsprechend so gewählt, dass im Körper trotz unmittelbar einsetzender Metabolisierung ein Serumspiegel des aktiven Wirkstoffs innerhalb des therapeutischen Bereichs erreicht wird (vgl. Abb. 2). Dieser beschreibt den Konzentrationsbereich, in dem ein Arzneimittel wirksam, aber noch nicht toxisch ist. Sub-therapeutische Medikamentenlevel führen somit zum Wirkverlust und können sogar die Ausbildung von Resistenzen fördern (Doring und Petzinger 2014), wohingegen Überdosierungen schwere Nebenwirkungen und toxische Reaktionen nach sich ziehen können; beispielsweise durch die vermehrte Bildung hepatotoxischer Metabolite wie bei der Biotransformation von Paracetamol durch CYP2E1 (Chai *et al.* 2016, Chang und Waxman 2006).

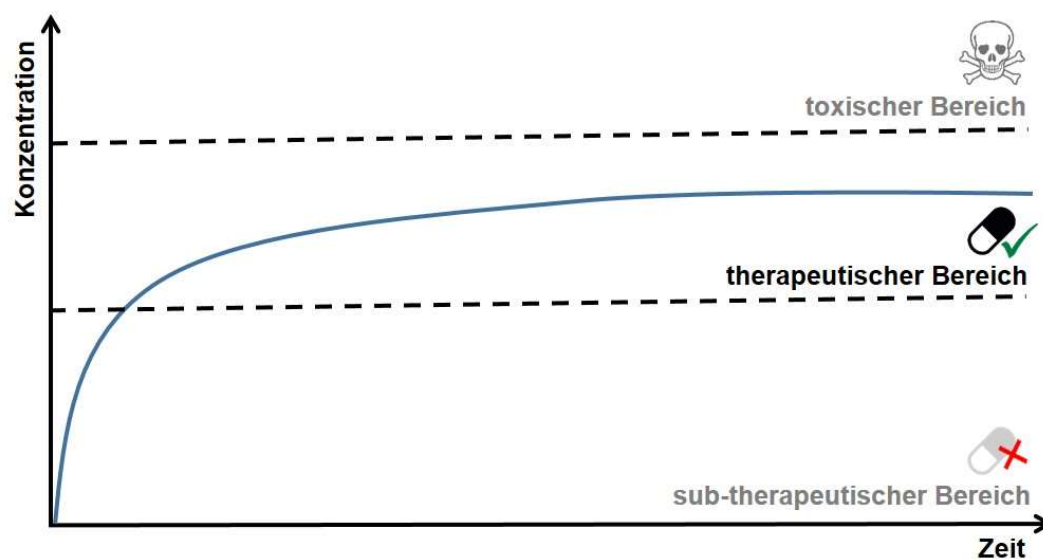


Abb. 2: Schematische Darstellung des Dosierungsziels medikamentöser Therapie

Die Dosierung eines Medikaments sollte so gewählt sein, dass sich die aktive Wirkstoffkonzentration mit der nach 5 Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) erreichten ‚steady state‘ im therapeutischen Bereich einpendelt. Dieser entspricht jenem Konzentrationsbereich, in dem ein Medikament wirksam, aber nicht toxisch ist (auch therapeutische Breite genannt). Die therapeutische Breite kann näherungsweise über den sogenannten therapeutischen Index bestimmt werden, welcher sich aus der Effektivdosis bei 50% der Patienten (ED_{50}) und der Letaldosis bei 50% der Probanden (LD_{50}) errechnet. In der Humanmedizin erfolgt die Berechnung aus ethischen Gründen häufig basierend auf der ED_{95} und der LD_5 , wobei sich der LD_5 -Wert in der Regel nicht auf Letalität, sondern Toxizität bzw. das Auftreten von Nebenwirkungen bezieht. Medikamente mit hoher therapeutischer Breite wie Glukokortikoide oder Penicillin gelten als verhältnismäßig sicher, wohingegen solche mit enger therapeutischer Breite wie Narkotika, Herzglykoside oder Anticonvulsiva einer ständigen Überwachung bedürfen.

(Konzentrationsschwankungen durch Medikamenteneinnahme und –abbau zur Vereinfachungen der Darstellung geglättet; modifiziert nach (Mutschler *et al.* 2013).

Im Regelfall enthalten Medikamente den relevanten Wirkstoff, welcher im Körper durch die Biotransformation abgebaut wird. Bei den sogenannten ‚Prodrugs‘ wird die pharmakologisch aktive Substanz jedoch erst durch die Metabolisierung im Patienten gebildet. Ein Beispiel hierfür ist Codein, welches durch CYP2D6 zu Morphin umgesetzt wird (Heller 2013). Die Dosierungsempfehlungen aller Medikamente erfolgen basierend auf den in klinischen Studien beobachteten durchschnittlichen Patientenreaktionen. Dennoch gibt es häufig schwerwiegende Probleme in der Pharmakotherapie. So reagieren im Mittel 30-70 % der Patienten nicht wie erwartet auf ein Arzneimittel (Heller 2013) und es können massive Plasmakonzentrationsunterschiede bei Patienten desselben Geschlechts und Alters auftreten. Medikamentöse Nebenwirkungen verursachen allein in den USA knapp 2 Mio. Hospitalisierungen jährlich, was 5-7% aller Aufnahmen entspricht (Dartnell *et al.* 1996, Eichelbaum 2013, Heller 2013, Lucado *et al.* 2006, Sultana *et al.* 2013) und stellen mit 0,32% der Todesfälle eine der primären Todesursachen noch vor Unfallfolgen oder Suizid (Buajordet *et al.* 2001, Eichelbaum 2013, Lazarou *et al.* 1998).

Viele unerwartete Medikamentenreaktionen kommen durch interindividuelle Varianz in der Wirkung zustande (Handschin und Meyer 2003). Einige dieser Unterschiede lassen sich auf Polymorphismen zurückführen. Vor allem die häufigen Einzelnukleotid-Polymorphismen (‚single nucleotide polymorphism‘ SNPs), welche sich in allen Genen des Fremdstoffmetabolismus finden, beeinflussen die katalytischen Eigenschaften oder die Enzymmenge derart, dass 10- bis 100-fache Schwankungen von Wirkstoffkonzentrationen auftreten können (Eichelbaum 2013). So konnten Divergenzen bei der Wirkung des Zytostatikums Irinotecan mit SNPs von PXR in Verbindung gebracht werden und Polymorphismen von CAR mit Veränderungen der Effizienz und Toxizität von Sunitinib und der Pharmakokinetik des HIV-Therapeutikums Efavirenz (Mbatchi *et al.* 2016). Insbesondere für CYPs sind erhebliche Expressionsschwankungen beschrieben, welche sich teilweise - jedoch nicht vollständig - durch die Expression unterschiedlicher Allele erklären lassen (Heller 2013, Schirmer *et al.* 2006) und Patientengruppen mit massiv divergierenden Metabolisierungsgeschwindigkeiten hervorrufen. So kann beispielsweise die hepatische Proteinmenge von CYP3A4 um Faktor 100 schwanken (Qiu *et al.* 2010) und der Codein-Umsatz durch CYP2D6 ist derart dramatisch beeinflusst, dass spezifische Richtlinien für die Dosierung abhängig vom Genotyp existieren (Heller 2013).

Aktuell geht man davon aus, dass CYP-Polymorphismen etwa 10-20% der unerwarteten Medikamenten-Wirkungen erklären (Hernandez *et al.* 2009). Weitere 50% sind auf den individuellen Expositionsstatus gegenüber anderen Fremdstoffen zurückzuführen (Hernandez *et al.* 2009). Dies beinhaltet einen nicht unerheblichen Anteil Medikamenteninteraktionen begünstigt durch die heute übliche Polypharmazie. So nimmt ein 65-jähriger Patient

durchschnittlich fünf Medikamente gleichzeitig ein (Cascorbi 2012, Willson und Kliewer 2002). Eine tragende Rolle spielt in diesem Zusammenhang die durch Xenosensoren vermittelte Induktion der Enzyme und Transporter der Phasen I-III (Handschin und Meyer 2003). So induzieren beispielsweise Johanniskrautprodukte gegen depressive Verstimmungen und nervöse Unruhe CYP3A4, was die verstärkte Metabolisierung parallel eingenommener Medikamente zur Folge hat. Auf Grund des breiten Substratspektrums von CYP3A4 können daraus Konsequenzen wie ungewollte Schwangerschaften (orale Kontrazeptiva) oder Organabstoßungen (Immunsuppressiva) entstehen (di Masi *et al.* 2009, Ernst 1999, Henderson *et al.* 2002, Piscitelli *et al.* 2000, Ruschitzka *et al.* 2000, Zhou *et al.* 2004).

Von mindestens genauso großer medizinischer Relevanz ist die Inhibition des Medikamentenstoffwechsels. So bewirken die Einnahme des Makrolidantibiotikums Erythromycin oder auch der überdurchschnittliche Konsum von Grapefruitsaft eine Hemmung von CYP3A-Enzymen, was den Metabolismus anderer Liganden einschränkt und deren Akkumulation fördert (Wilkinson 2005). Insbesondere bei Medikamenten mit enger therapeutischer Breite werden dann schnell toxische Konzentrationen erreicht (Cascorbi 2012), welche lebensbedrohliche Nebenwirkungen wie Rhabdomyolyse (Statine) oder Herzrhythmusstörungen (Calciumantagonisten wie Verapamil), hervorrufen können (Ray *et al.* 2004, Slaughter 2013). In einzelnen Fällen wird die Inhibition jedoch bewusst hervorgerufen und ökonomisch zur Dosisreduktion teurer Medikamente genutzt. So ermöglicht die Applikation des CYP3A4-inhibierenden HIV-Therapeutikums Ritonavir die Dosisreduktion anderer durch CYP3A4 metabolisierter HIV-Medikamente wie Saquinavir um bis zu 75%, da diese durch die enzymatische Hemmung stark erhöhte Plasmakonzentrationen aufweisen (Doring und Petzinger 2014, Flexner 2000, Merry *et al.* 1998, Zee *et al.* 2012).

Die übrigen Nebenwirkungen, welche nicht auf Polymorphismen, Inhibition oder Induktion zurückzuführen sind, können häufig durch physiologische Ursachen wie Vorerkrankungen von Leber oder Niere oder Fehlverhalten von Patienten erklärt werden. Allerdings existieren auch viele interindividuelle Varianzen bei der Wirkung von Medikamenten, deren zugrundeliegende molekulare Mechanismen bislang nicht vollständig geklärt werden konnten (Yang und Wang 2014). Eine mögliche in diesem Zusammenhang diskutierte Ursache könnten epigenetische Prozesse und Prädispositionen sein (Christensen *et al.* 2009, Kacevska *et al.* 2011, Mirbahai und Chipman 2014). Auch für Pathogenese, Krankheitsprädispositionen und erbliche Merkmale wie Körpergröße nimmt man in vielen Fällen die Beteiligung epigenetischer Mechanismen an, da extensive genomweite Analysen nur wenige genetische Ursachen zu Tage gefördert haben (Bajrami und Spiroski 2016, Gluckman *et al.* 2011).

1.6 Generationsübergreifende epigenetische Effekte

Der Begriff Epigenetik wurde bereits 1942 von Conrad Hal Waddington geprägt (Lopomo *et al.* 2016). Er beschreibt mitotisch und meiotisch vererbare Veränderungen der Genexpression, die nicht in der DNA-Sequenz festgelegt sind, sondern sich ‚oberhalb‘ von ihr abspielen und auf Änderungen der Chromatinstruktur durch Histonmodifikationen oder DNA-Methylierung und die Aktivität von ncRNAs (non-coding RNAs) zurückzuführen sind (Bajrami und Spiroski 2016, Egger *et al.* 2004, Lopomo *et al.* 2016). Während die Beständigkeit epigenetischer Marker in der mitotischen Zellteilung bereits früh gut charakterisiert war, rückte die Untersuchung der meiotischen Übertragung erst Mitte der 2000er Jahre ins Zentrum des öffentlichen Interesses (Gluckman *et al.* 2011, Hughes 2014). Große epidemiologische Studien postulierten zu dieser Zeit generationsübergreifende epigenetische Prägungen mit nachhaltigem Einfluss auf die Gesundheit ausgelöst durch Umwelteinflüsse wie Ernährung, Stress oder Fremdstoffe (Gallou-Kabani *et al.* 2007, Hughes 2014). Eine 2016 veröffentlichte Analyse der Datenbank PubMed zeigt jedoch, dass auch heute der überwiegende Teil aller Publikationen zum Thema Epigenetik einen intragenerationalen Fokus (>93%) hat und sich mit der genauen Aufklärung der zu Grunde liegenden zellulären Mechanismen und deren Rolle in der Zelldifferenzierung und der Pathogenese von Krankheiten beschäftigt (Burggren 2016, Nilsson und Skinner 2015).

Generationsübergreifende epigenetische Effekte bedingen Vererbungsprozesse außerhalb der Mendel'schen Grenzen (Bajrami und Spiroski 2016). So führt beispielsweise Imprinting, welches mindestens 100 Gene betrifft, epigenetisch zur Ausprägung ausschließlich eines elterlichen Allels (Bajrami und Spiroski 2016, Hughes 2014). Im Fall des ersten identifizierten von Imprinting betroffenen Gens IGF2 (Insulin-like growth factor 2) ist beispielsweise das paternale Allel aktiv, wohingegen das maternale Allel inaktiv ist (Bajrami und Spiroski 2016, Griffiths 2008). Auch viele andere epigenetische intergenerationale Prozesse scheinen geschlechtsspezifisch entweder nur innerhalb einer Keimbahn oder sogar nur auf Nachkommen eines bestimmten Geschlechts vererbt zu werden. Dabei gilt es bei keimbahnspezifischen Effekten zu berücksichtigen, dass der paternale Einfluss in vielen Spezies mit der Befruchtung endet. Die Übertragung muss entsprechend über die Spermien verlaufen oder durch andere Bestandteile der Samenflüssigkeit. Neben Konsequenzen durch den Transfer von ncRNAs in Spermien (RNA Shutteling) (Gluckman *et al.* 2011) und chromatinmodifizierenden Markern, die die Reprogrammierung in der Gametogenese überdauern (Bajrami und Spiroski 2016, Hughes 2014, Rousseaux *et al.* 2005, Sasaki und Matsui 2008) konnten Bromfield *et al.* (2014) durch Entfernung der Bläschendrüsen in Mäusen einen Einfluss der Samenflüssigkeit auf Energie- und Hormonstoffwechsel der Nachkommen zeigen (Hughes 2014). Maternal hingegen kann der Einfluss neben stabilen epigenetischen

Veränderungen in den Keimzellen (Daxinger und Whitelaw 2012, Radford *et al.* 2014) auch auf Umwelteinflüsse wie Ernährung oder Stress während Schwangerschaft und Brutpflege zurückzuführen sein (Daxinger und Whitelaw 2012, Day *et al.* 2016). So führt beispielsweise maternaler Stress während der Brutpflege zu gestresstem Nachwuchs mit verringerter Expression des Glukokortikoidrezeptors (GR) im Hippocampus (Weaver *et al.* 2004, Weaver *et al.* 2007). Und auch frühe postnatale Stresserfahrungen der Jungtiere selbst - ausgelöst durch Trennung von der Mutter - führen zu gesteigerter Unruhe, welche sich in weitere nachfolgende Generationen überträgt (Scofield und Kalivas 2013).

Bei der Analyse generationsübergreifender Effekte sollte man darüber hinaus multigenerationale Effekte, welche sich potentiell auf direkte Exposition der Keimzellen oder Nachkommen innerhalb des Körpers der Eltern zurückführen lassen (Burggren 2016), von transgenerationalen Effekten unterscheiden (vgl. Abb. 3)

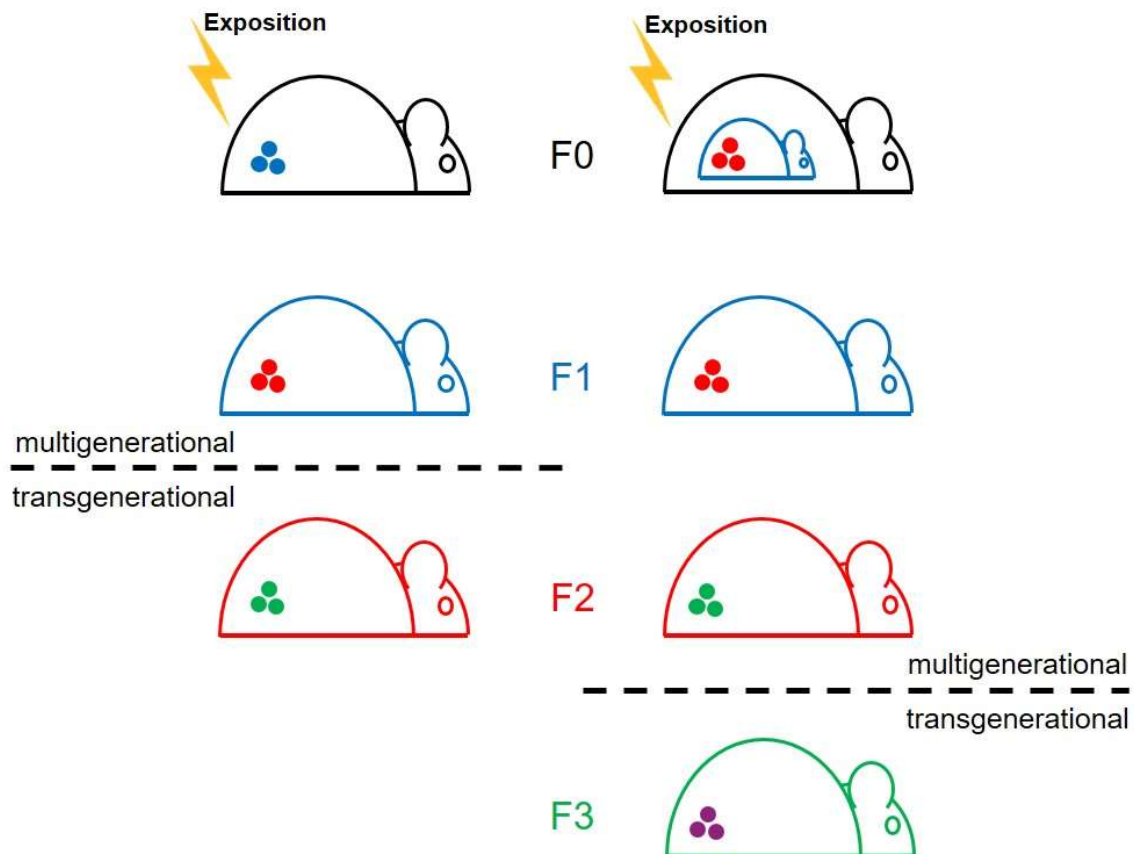


Abb. 3: Unterscheidung multigenerationaler und transgenerationaler Effekte

Hinsichtlich erblicher generationsübergreifender Effekte gilt es multigenerationale von transgenerationalen Effekten zu unterscheiden. Sind Effekte nur in Nachkommen nachweisbar, die zum Zeitpunkt der Exposition bereits als Keimzellen oder Föten existierten und somit möglicherweise direkt exponiert waren, spricht man von multigenerationalen Effekten. Erst der Nachweis in einer Generation, deren zugrundeliegende Keimzellen nicht exponiert waren, erlaubt es von transgenerationalen Effekten zu sprechen. Während dies bei Exposition männlicher F₀ Tiere bzw. weiblicher Tiere vor der Konzeption (links) bereits in der Enkel-Generation (F₂) der Fall ist, können generationsübergreifende Effekte nach der Exposition schwangerer F₀-Weibchen (rechts) erst in der Ur-Enkel-Generation (F₃) als transgenerational bezeichnet werden (Skinner 2008).

(modifiziert nach (Baker *et al.* 2014, Blake und Watson 2016))

Transgenerationale epigenetische Effekte konnten in Pflanzen, Insekten, Fischen, Nagern, Schweinen und im Menschen nach dem Einfluss von Temperatur, Stress, Ernährung und Toxine nachgewiesen werden (Skinner 2015). Aufgrund der zunehmenden Inzidenz metabolischer Erkrankungen (WHO 2016a, b) stand insbesondere die Erforschung des epigenetischen Einflusses von Ernährung im Zentrum des Interesses. Epidemiologische Studien von Kindern, die während Hungersnöten im zweiten Weltkrieg ausgetragen wurden, zeigen eine deutliche Korrelation zwischen prä- und postnatalem Ernährungsstatus und der Inzidenz von chronisch metabolischen Erkrankungen und KHK (koronare Herzkrankheit). Während die Kinder des niederländischen Hungerwinters 1944/1945 („Dutch Famine“) auf Grund der extrem guten postnatalen Ernährungssituation eine Prädisposition für Adipositas und KHK zeigen, welche sich in der weiblichen Linie in die Enkel-Generation fortsetzt (Gluckman *et al.* 2011, Painter *et al.* 2008, Veenendaal *et al.* 2013), haben jene, welche zur Zeit der Belagerungen von Leningrad und Stalingrad ausgetragen wurden und auch postnatal schlechtere Ernährungsbedingungen hatten, deutlich weniger chronische metabolische Erkrankungen (Lopomo *et al.* 2016). Die beobachteten Unterschiede lassen sich darauf zurückführen, dass die Entwicklungsplastizität es Föten erlaubt, sich bereits im Mutterleib epigenetisch an die zukünftige Umwelt anzupassen (fötale Programmierung). Diese Adaption kann sich - wie im Fall der niederländischen Kinder - bei veränderten Bedingungen aber langfristig als schädlich erweisen (Gluckman *et al.* 2011, Lopomo *et al.* 2016). Vergleichbare Ergebnisse konnten in Ratten nach fötaler Unterernährung nachgewiesen werden. Die Nachkommen hatten langfristig höhere Körperfettanteile und zeigten faules Verhalten, was durch hochkalorische Diät eskaliert werden konnte (Gluckman *et al.* 2011). Untersuchungen zu pränataler Unterernährung in Mäusen zeigten dauerhafte Veränderungen der DNA-Methylierung sowie reduzierte Geburtsgewichte in der paternalen Linie (Jimenez-Chillaron *et al.* 2009, Radford *et al.* 2014). Eine Meta-Analyse von 11 Ratten-Studien zu fettreicher Ernährung während der Schwangerschaft belegte erhöhte Diabetes mellitus Typ 2 (DM2) und Adipositas Risiken in den F1-Tieren (Ainge *et al.* 2011) und auch die Untersuchung der Nachkommen männlicher prädiabetischer Mäuse ergab eine erhöhte Inzidenz für DM2 in zwei Folgegenerationen (Hughes 2014).

Weitere Untersuchungen zu generationsübergreifenden Effekten wurden insbesondere im toxikologischen Bereich durchgeführt. So konnte 2005 erstmals ein transgenerationaler Effekt in Säugern nach Exposition mit einem Pestizid gezeigt werden (Hughes 2014). In Nachkommen schwangerer Ratten, die dem Fungizid Vinclozolin ausgesetzt worden waren, konnten eine verminderte männliche Fertilität in bis zu vier Folgegenerationen, Veränderungen in der DNA-Methylierung und eine abnorme Expression verschiedener ncRNAs nachgewiesen werden (Anway *et al.* 2005, Brieno-Enriquez *et al.* 2015). Vergleichbare Korrelationen zwischen Toxinen und einer eingeschränkten männlichen oder weiblichen Fertilität durch

Fehlbildungen oder Störungen der Organfunktionen werden auch für zahlreiche andere Substanzen wie DDT (Dichlordiphenyltrichlorethan) oder Dioxin (TCDD, 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin) angenommen (Ma *et al.* 2015, Nilsson und Skinner 2015). Epidemiologische Studien belegen beispielsweise eine Verbindung von pränataler Phthalat-Exposition und Hypospadie (Kalfa *et al.* 2015, Skinner 2016) und für das Insektizid Methoxychlor ergaben Experimente in Ratten eine gesteigerte Inzidenz von Nierenleiden, Übergewicht und ovarialen Erkrankungen (Manikkam *et al.* 2014). Auch für den Weichmacher Bisphenol A (BPA) konnten in den Hoden von Ratten Veränderungen der Genexpression bis zur dritten Generation (Salian *et al.* 2009) und im Zebrafisch eine gesteigerte Inzidenz von Herzfehlern und koronaren Erkrankungen in der Enkelgeneration nachgewiesen werden (Lombo *et al.* 2015). Darüber hinaus gibt es einige Studien zu erblichen Verhaltensänderungen nach Fremdstoffexposition. So resultiert der Kontakt schwangerer Mäuse mit dem Weichmacher DEHP (Diethylhexylphthalat) in veränderten Stress-Hormonspiegeln und entsprechendem Verhalten noch in der dritten Folgegeneration (Quinnies *et al.* 2015, Skinner 2016) und antrainiertes Angstverhalten bei Acetophenon-Geruch wird transgenerational an die Enkel vererbt (Dias und Ressler 2014, Hughes 2014). In Ratten konnte des Weiteren ein Zusammenhang zwischen paternalem Kokain-Konsum, einer auf Promotoracetylierung zurückzuführenden erhöhten Expression von Bdnf (Brain-derived neurotrophic factor) und einem Kokain-resistenten Phänotyp in männlichen Nachkommen hergestellt werden (Scofield und Kalivas 2013, Vassoler *et al.* 2013).

Während generationsübergreifende Analysen bezüglich der Folgen von Drogenkonsum oder der Exposition mit Umweltgiften häufig durchgeführt werden, sind sie für Medikamente eine Seltenheit. Neben der Untersuchung mutagener Keimbahn-Effekte durch Zytostatika und deren Folgen für die Filialgeneration sind entsprechend wenige die Nachkommen betreffende Konsequenzen medikamentöser Therapien bekannt. Lediglich multigenerationale Effekte auf die direkten Nachkommen nach fötaler Exposition im Mutterleib finden Beachtung. Eines der wohl bekanntesten Beispiele ist die erhöhte Inzidenz von Spina bifida nach antiepileptischer Therapie mit Valproat (Robert 1983). Und auch bei Behandlung mit Phenobarbital in der Schwangerschaft konnten Korrelationen zu genitalen Fehlbildungen und nicht abgestiegenen Hoden beobachtet werden, welche auf den CAR-vermittelten Anstieg des Testosteron-Metabolismus zurückgeführt werden (Hernandez *et al.* 2009). Die genauen molekularen Mechanismen, die derartigen generationsübergreifenden epigenetischen Effekten zu Grunde liegen, sind jedoch weitestgehend unbekannt. Da jedoch in den vergangenen Jahren für zahlreiche der in diesem Kapitel aufgeführten organischen Schadstoffe wie Methoxychlor (Blizard *et al.* 2001, Handschin und Meyer 2003, Hernandez *et al.* 2009, Savary *et al.* 2014), DEHP oder BPA (DeKeyser *et al.* 2011) die Aktivierung von CAR nachgewiesen werden

konnte, könnte die Aktivierung des Fremdstoffmetabolismus durch CAR (oder PXR) möglicherweise eine Rolle spielen.

1.7 Generationsübergreifende Induktion von CAR Zielgenen

Bisher ging man davon aus, dass die Induktion des Fremdstoffmetabolismus nicht nur gewebsspezifisch, schnell und dosisabhängig, sondern auch reversibel und auf die Expositionszeit begrenzt sei (Handschin und Meyer 2003), um Störungen des endogenen Metabolismus (vgl. 1.4) zu minimieren, wie sie bei der Langzeitbehandlung mit CAR Liganden vielfach auftreten (Moreau *et al.* 2008). Beispielsweise wird für längere Therapien mit ankrampflösen Medikamenten (Lee *et al.* 2010, Meier und Kraenzlin 2011, Pack und Morrell 2004) oder mit Glucocorticoiden (di Masi *et al.* 2009) häufig eine Reduktion der Knochenmineraldichte beschrieben. Vor kurzem konnte jedoch gezeigt werden, dass einige Zielgene nach einer einzelnen Injektion neonataler Mäuse mit dem spezifischen CAR-Aktivatoren TCPOBOP langanhaltend induziert werden. Chen *et al.* (2012) beobachteten bei der Analyse von 21 CAR-Zielgenen eine mindestens 24 Monate andauernde Expressionssteigerung von Cyp2b10 und Cyp2c37. Vergleichbares detektierten auch Li *et al.* (2016) bei ihren Microarray Transkriptomanalysen nach neonataler TCPOBOP Exposition; zusätzlich konnten sie jedoch auch anhaltende Veränderungen der Expression von Cyp2c55 und Sult5a1 nachweisen.

Chen *et al.* (2012) führen die langfristige Beeinflussung der hepatischen Cyps auf epigenetische Veränderungen in den Promotorbereichen zurück. Sie ermittelten eine Zunahme von transkriptionsaktivierenden H3K4-Methylierungen (mono-, di- & tri-) sowie eine Reduktion repressiver H3K9- und H3K27-Trimethylierungen. Vergleichbare molekulare Veränderungen im Promotorbereich von Cyp2b10 sahen auch Lempiäinen *et al.* (2011) bei einer genomweiten Analyse adulter Mäuse nach 28-tägiger oraler Phenobarbital-Aufnahme. Neben einer Abnahme der H3K27-Trimethylierungen und einer Zunahme aktivierender H3K9-Acetylierungen registrierten sie eine DNA-Hypomethylierung im Promotorbereich. Anhaltende Expressionssteigerungen nach neonataler Phenobarbital-Exposition konnten Tien *et al.* (2015) zeigen. Sie beobachteten die persistierende Induktion von Cyp2b10, Cyp3a11 und Cyp2c29 nach Injektion neugeborener Mäuse innerhalb eines sensitiven Fensters in der frühen postnatalen Phase.

Frau Dr. Marianne Mathäs gelang es im Rahmen Ihrer Promotion (Mathäs 2014) die von Chen *et al.* (2012) beobachtete anhaltende Induktion von Cyp2b10 nach TCPOBOP Exposition zu bestätigen (vgl. Abb. 4C) und darüber hinaus eine multigenerationale Übertragung in die Nachkommen exponierter Weibchen nachzuweisen (vgl. Abb. 4D). Während die bislang beobachteten Veränderungen von den Autoren der neonatalen Entwicklungsplastizität

zugeschrieben wurden, konnte Frau Dr. Marianne Mathäs vergleichbare Ergebnisse auch nach Injektion adulter Tiere zeigen, was die Relevanz auf Grund der im Allgemeinen häufigeren Fremdstoffexposition Erwachsener steigert.

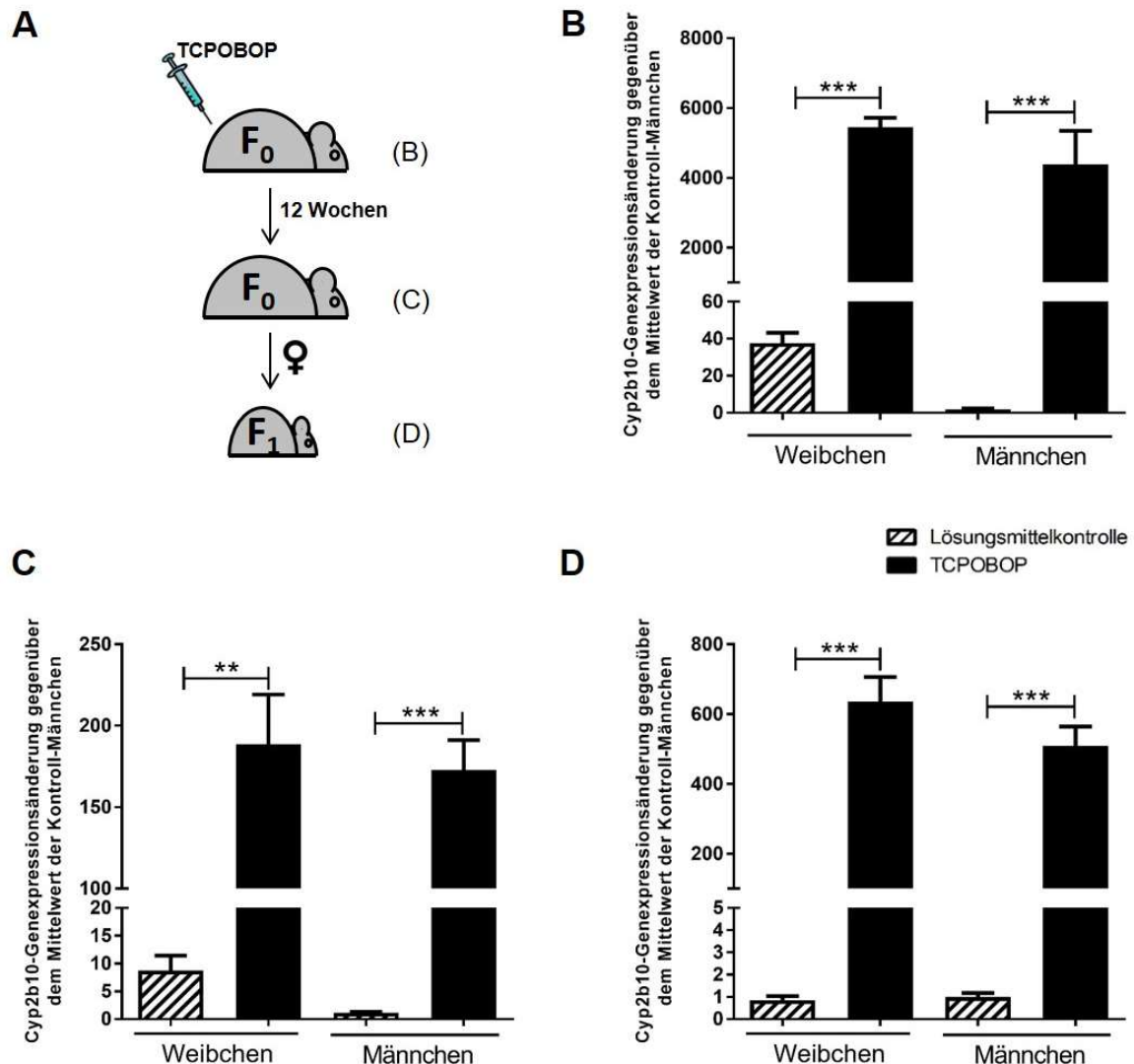


Abb. 4: Anhaltende und Multigenerationale Induktion von Cyp2b10 nach TCPOBOP-Exposition

(A) Schematische Darstellung der von Frau Dr. Marianne Mathäs im Rahmen ihrer Promotion durchgeführten Experimente. Adulte weibliche und männliche C57BL/6 Mäuse wurden einmalig mit TCPOBOP (3mg/kg i.p. in DMSO/Maiskeimöl [10/90]) behandelt. Die hepatische Cyp2b10-mRNA Expression wurde in F₀ Mäusen nach 3 Tagen (B), nach 3 Monaten (C) und in den Nachkommen weiblicher F₀ Tiere (verpaart mit unbehandelten Böcken) im Alter von 6 Tagen (D) mittels TaqMan® und $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode ermittelt. (B-D) Dargestellt sind die Genexpressionsänderungen gegenüber dem Mittelwert der männlichen Tiere der Lösungsmittelkontrolle (Mittelwert mit Standardfehler). (B+C) Adulte Weibchen haben relativ gesehen geringere Induktionswerte im Vergleich zu Männchen, da die hepatische Cyp2b10 Expression bei Weibchen mit dem Alter zunimmt und so basal höher ist (Jarukamjorn *et al.* 2006, Jarukamjorn *et al.* 1999, Ledda-Columbano *et al.* 2003).

(B+C) Reproduktion der Original-Experimente von Fr. Dr. Marianne Mathäs, (D) Originaldaten von Frau Dr. Marianne Mathäs; Statistisch signifikante Unterschiede wurden abhängig vom Ergebnis eines Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung mittels Einfaktorieller Varianzanalyse und Bonferroni-Korrektur (B, D) oder Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-hoc Test (C) ermittelt und mit Sternchen gekennzeichnet (***, P < 0,001; **, P < 0,01); (B) n = 5-6, (C) n = 10-12, (D) n = 5-10

Alternativ zu den von Chen *et al.* (2012) postulierten epigenetischen Änderungen, welche zur Erzeugung einer generationsübergreifenden Induktion von Cyp2b10 die Reprogrammierung

in der Keimzellbildung überdauern müssten (Bajrami und Spiroski 2016, Hughes 2014, Rousseaux et al. 2005, Sasaki und Matsui 2008), ist für die nach TCPOBOP Exposition beobachtete multigenerational beeinflusste Expression von Cyp2b10 auch ein anderer Mechanismus plausibel. Ebenso gut könnte der Effekt durch eine Akkumulation des hochpotenten, lipophilen Liganden TCPOBOP im Fettgewebe (Poland et al. 1980, Smith et al. 1993) und sukzessive Übertragung durch die Plazenta bzw. Muttermilch ausgelöst werden.

1.8 Zielsetzung

Generationsübergreifende Effekte ausgelöst durch Medikamente oder andere Fremdstoffe lange vor der Konzeption wären im Menschen medizinisch hoch-relevant, da sie zu erheblichen Beeinflussungen der Gesundheit von Mutter und Kind führen könnten. Mögliche Konsequenzen für die Nachkommen könnten ein abweichender Medikamentenstoffwechsel oder Veränderungen in Energie- oder Knochenstoffwechsel sowie potentiell daraus resultierende Prädispositionen für Erkrankungen wie Osteoporose oder Diabetes sein. Während toxikologisch häufig generationsübergreifende Analysen durchgeführt werden, ist das Spektrum der Medikamente, die vor einer Schwangerschaft eingenommen erbliche Langzeit-Effekte induzieren, bislang weitgehend unklar (vgl. 1.6).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Fortsetzung des von Frau Dr. Marianne Mathäs im Rahmen ihrer Promotion begonnenen Projekts zu multigenerationalen Effekten nach CAR-Aktivierung. Nach einer Validierung der bislang RNA-basierten Resultate auf Proteinebene sollen dafür zunächst phänotypischen Konsequenzen hinsichtlich der Kapazität des Fremdstoffmetabolismus mittels medikamentös-induzierter Paralyse untersucht werden.

Ausgehend von den zahlreichen endogenen Funktionen von CAR (vgl. 1.4) sind auch Störungen in Glucose-, Fett- oder Knochenmetabolismus exponierter Individuen und ihrer Nachkommen vorstellbar. Entsprechend soll der hepatische Energiemetabolismus sowohl auf transkriptioneller Ebene anhand von Expressionsanalysen verschiedener Markergene als auch auf funktioneller Ebene durch Blutanalysen und Glukosetoleranztests untersucht werden. Die Analyse des Knochenstoffwechsels soll anhand der Knochenmineraldichte und verschiedener Strukturparameter mittels Mikro-CT und einiger assoziierter Serumparameter erfolgen.

Um zukünftig verschiedene Medikamente und Xenobiotika hinsichtlich ihres potentiellen Risikos, vergleichbare generationsübergreifende Effekte zu induzieren, untersuchen zu können, ist darüber hinaus eine genaue mechanistische Aufklärung der Transmissions-Vorgänge von fundamentaler Wichtigkeit. Die klare Differenzierung zwischen den postulierten epigenetischen/präuterinen und intrauterinen Übertragungsmechanismen soll dafür zunächst

durch IVF- (In-vitro-Fertilisation) und Embryotransfer-Experimente erreicht werden. Zur weiteren Aufklärung des genauen Mechanismus sollen darüber hinaus Möglichkeiten zur Übertragung durch die männliche Keimbahn und durch Muttermilch analysiert werden.

Langfristig könnte die Aufklärung des Mechanismus eine Abschätzung des Risikopotentials verschiedener Medikamente und Fremdstoffe anhand ihrer individuellen Stoffeigenschaften ermöglichen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen bereits vorab die humanmedizinisch-relevanten CAR-Induktoren Phenobarbital, Phenytoin und Carbamazepin auf ihr Potential vergleichbare Effekte hervorzurufen analysiert werden.

2 Material und Methode

2.1 Material

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle verwendeten Chemikalien im höchsten verfügbaren Reinheitsgrad von der Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim / Merck KGaA, Darmstadt) bezogen. Arbeiten mit RNA erfolgten mit RNase freiem DEPC-Wasser (vgl. Tab. 1); für alle anderen Anwendungen wurde zweifach entionisiertes Reinstwasser (Typ 1) aus einem Synergy® UV Reinstwassersystem (Millipore SAS, Molsheim Frankreich / Merck KGaA, Darmstadt) genutzt. Die verwendete Plastikware wurde in handelsüblicher Qualität und Reinheit von Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen) oder Eppendorf (Hamburg) bezogen.

2.1.1 Puffer und Lösungen

Tab. 1: Puffer und Lösungen

Auflistung und Zusammensetzung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen

¹ Carl Roth Karlsruhe

² Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2x Probenpuffer (SDS-Page)	125 mM Tris/HCl (pH 6,8) 40mM Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) 2 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 20 % Glycerin 4 % Natriumlaurylsulfat (SDS) 0,02 % Bromphenolblau in Reinstwasser
6x DNA-Ladepuffer (Agarose-Gelelektrophorese)	40,0 % Saccharose 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylene Cyanol FF Farbstoff in Reinstwasser
10x HK Puffer (TaqMan)	200 mM Tris/HCl (pH 8,7) 100 mM Ammoniumsulfat 100 mM Kaliumchlorid 40 mM Magnesiumchlorid-Hexahydrat in Reinstwasser
Base Solution 50x Stammlösung (DNA-Isolation)	25 % 5N Natronlauge 2 % 0,5M Ethylendiamintetraacetat (EDTA) in Reinstwasser

Blocking-Puffer (Westernblot)	5% Milchpulver in TBS-T
Blottingpuffer (Westernblot)	192 mM Glycin 25 mM Tris 10 % Methanol in Reinstwasser
Carbamazepin-Injektionslösung (20 mg/kg)	2,86 mg/ml Carbamazepin 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in Maiskeimöl
DEPC Wasser (RNA)	0,1 % Diethylpyrocarbonat ¹ (DEPC) in Reinstwasser
dNTP-Mix (TaqMan)	20 mM dATPs 20 mM dCTPs 20 mM dGTPs 20 mM dTTPs in Reinstwasser
Laufpuffer (SDS Page)	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1 % Natriumlaurylsulfat (SDS) in Reinstwasser
Neutralization Solution 50x Stammlösung (DNA-Isolation)	31,5 % Tris/HCl in Reinstwasser
PBS (pH 7,4) 10x Stammlösung (ELISAs / HPLC)	135 mM Calciumchlorid 32 mM Dinatriumhydrogenphosphat 13 mM Kaliumchlorid 5 mM Kaliumhydrogenphosphat in Reinstwasser
Phenobarbital-Trinkwasser	0,05 % Phenobarbital-Natriumsalz in Reinstwasser
Ponceau S-Lösung (Westernblot)	40 % Methanol 15 % Eisessig 0,25 % Ponceau S in Reinstwasser

RIPA-Puffer (Proteinextraktion)	150 mM Natriumchlorid 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) 1 % Nonidet P-40 (IGEPAL®) oder Triton-X-100 0,5 % Natriumdesoxycholat (C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄) 0,1 % Natriumlaurylsulfat (SDS) in Reinstwasser
RIPA-Puffer + Protease-Inhibitor (Proteinextraktion)	10 µl 0,5M Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 1 ,Roche cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablette ² in 1ml RIPA-Puffer
Sammelgel 4%ig (SDS-Page)	1,25 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,65 ml 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid 50 µl 10% Natriumlaurylsulfat (SDS) 33 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS) 7 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED) in 3,0 ml in Reinstwasser
TAE-Puffer (pH 8,5) 50x Stammlösung (Agarose-Gelelektrophorese)	2M Tris 1M Eisessig 0,05M Dinatrium-EDTA-Dihydrat in Reinstwasser
TBS (pH 7,4) (Westernblot)	150 mM Natriumchlorid 10 mM Tris in Reinstwasser
TBS-T (Westernblot)	0,05% Tween 20 in TBS
TCPOBOP-Injektionslösung (a) (3 mg/kg Körpergewicht)	± 0,43 mg/ml 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (<i>optional</i>) in Maiskeimöl
TCPOBOP-Injektionslösung (b) (0,5 mg/kg Körpergewicht)	± 0,1 mg/ml in Maiskeimöl
TCPOBOP-Injektionslösung (c) (0,6 mg/kg Körpergewicht)	20% TCPOBOP-Injektionslösung (a) in Maiskeimöl
TCPOBOP-Injektionslösung (d) (0,3 mg/kg Körpergewicht)	10% TCPOBOP-Injektionslösung (a) in Maiskeimöl
TCPOBOP-Injektionslösung (e) (0,03 mg/kg Körpergewicht)	10% TCPOBOP-Injektionslösung (d) in Maiskeimöl

TCPOBOP-Injektionslösung (f) (0,006 mg/kg)	20% TCPOBOP-Injektionslösung (e) in Maiskeimöl
TCPOBOP-Injektionslösung (g) (0,003 mg/kg)	10% TCPOBOP-Injektionslösung (e) in Maiskeimöl
Trenngel 12%ig (SDS-Page)	3 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %) 1,9 ml 1,5M Tris/HCl (pH 8,8) 75 µl 10% Natriumlaurylsulfat (SDS) 50 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS) 5 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED) in 2,5 ml Reinstwasser
Zoxazolamin-Injektionslösung (175 mg/kg)	11,67 mg/ml Zoxazolamin 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in Maiskeimöl

2.1.2 Primer-Sequenzen

Primer und Sonden wurden - wenn nicht anders gekennzeichnet - von der Sigma Aldrich Chemie GmbH (Hamburg / Merck KGaA Darmstadt) bezogen und vor der Verwendung mit Reinstwasser oder 10 mM Tris (pH 8,5) auf 10 mM eingestellt.

Tab. 2: Primer & Sonden

Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten DNA-Oligonukleotide

v = Vorwärtsprimer; r = Rückwärtsprimer; S = Sonde; P = Primer

¹ alternativ TaqMan mittels kommerziellem Primer-Sonde-Mix (#Mm03928990_g1; Applied Biosystems™ / Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA)

Gen	Sequenz (5' → 3')	Anwendung	Literaturquelle
Cyp2b10	v: GACTTTGGGATGGGAAAGAG r: CCAAACACAATGGAGCAGAT S: ACGTTCCTCTTCCAGTGCATCAC	TaqMan	P: (Chen <i>et al.</i> 2012) S: <i>manuell entworfen</i> von Dr. Marianne Mathäs
Cyp3a11	v: AGAACTTCTCCTTCCAGCCTTGTA r: GAGGGAGACTCATGCTCCAGTTA S: CTAAGGTTGTGCCACGGGATGCAGT	TaqMan	(Gnerre <i>et al.</i> 2005)
Cyp2c29	v: GCTCAAAGCCTACTGTCA r: CATGAGTGTAATCGTCTCA	SYBR	(Jackson <i>et al.</i> 2004)
18s rRNA	v: GCTGCTGGCACCAGACTT r: CGGCTACCACATCCAAGG	SYBR ¹	(Koch <i>et al.</i> 2002)
SRY	v: AGAGATCAGCAAGCAGCTGG r: TCTTGCCTGTATGTGATGGC	Multiplex-PCR	(Lavrovsky <i>et al.</i> 1998)
Tshb	v: AACGGAGAGTGGGTCATCAC r: CATTGGGTTAAGCACACAGG	Multiplex-PCR	(Lavrovsky <i>et al.</i> 1998)
G6Pc	v: CTGTGATTGCTGACCTGAGGAA r: ATTATAGGCACGGAGCTGTTG	SYBR	<i>manuell entworfen</i>
Pck1	v: CGTTTTCTGGGTTGATAGCC r: CCTAGTGCCTGTGGGAAGAC	SYBR	<i>manuell entworfen</i>

Apoa1	v: CCAGAGTGTCCCAGTTTTCC r: TATGTGGATGCGGTCAAAGA	SYBR	<i>manuell entworfen</i>
Sreb1	v: GACAGCTTAGCCTCTACACCAACT r: GACTGGTACGGGCCACAAGAA	SYBR	<i>manuell entworfen</i>
Ppara	v: ACGATGCTGTCCTCCTTGATG r: GTGTGATAAAGCCATTGCCGT	SYBR	<i>manuell entworfen</i>
Pparγ	v: ACCACAGTTGATTTCTCCAG r: TGTTGTAGAGCTGGGTCTTT	SYBR	<i>manuell entworfen</i>
Col1a1	v: GAGCGGAGAGTACTGGATCG r: TACTCGAACGGGAATCCATC	SYBR	<i>manuell entworfen</i>
Col3a1	v: ACCTCCTGGTGCTCTTGGT r: CTCTGTGTCTTTTCATACCAGG	SYBR	<i>manuell entworfen</i>
Cyp2b10 Promotor	v: AAGGGAATGAGGAGTGAGCA r: CAAGAAGCCACAAGGAGAG	SYBR (ChIP)	(Chen <i>et al.</i> 2012)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 RNA-Extraktion

Die Extraktion muriner hepatischer RNA erfolgte mit ‚peqGOLD TriFast™‘ (peqlab Biotechnologie GmbH / VWR Life Science Competence Center, Erlangen) nach leicht modifiziertem Herstellerprotokoll: Dafür wurden zunächst etwa 30 mg Lebergewebe in 1 ml ‚peqGOLD TriFast™‘ im ‚Qiagen TissueLyser LT‘ (Qiagen GmbH, Hilden) für 4 min bei 50 Hz homogenisiert. Nach 5 min Inkubation bei RT (Raumtemperatur) wurden 200 µl Chloroform zugegeben und durch kräftiges Schütteln für etwa 15 s mit dem Homogenat emulgiert. Die Trennung der Phenol-Chloroform-Phase und der wässrigen Phase wurde nach 3 min Inkubation bei RT durch Zentrifugation für 15 min bei 13.000 g und 4°C erreicht (Hettich® Rotina 35R; Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen). Die klare wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, zur alkoholischen Fällung der RNA mit 500 µl Isopropanol gemischt und über Nacht bei -20°C gelagert. Am nächsten Morgen wurde die präzipitierte RNA durch 20 min Zentrifugation bei 12.000 g und 4°C pelletiert und daraufhin zweimal mit 1 ml kaltem (-20°C) Ethanol (75% in DEPC-Wasser) gewaschen. Abschließend wurde das luftgetrocknete Pellet auf Eis stehend in 70 µl DEPC-Wasser gelöst bevor die RNA Konzentration in 1 µL der Lösung photometrisch am NanoDrop™ ND-2000 (peqlab Biotechnologie GmbH / VWR Life Science Competence Center, Erlangen) bestimmt und die RNA bei -80°C gelagert wurde.

2.2.2 cDNA-Synthese

Die reverse Transkription hepatischer RNA in cDNA wurde mit dem ‚High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit‘ (Applied Biosystems™ / Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA) basierend auf 1 µg RNA ohne Zusatz von RNase-Inhibitoren in einem ‚Eppendorf

Mastercycler® gradient[†] (Eppendorf AG, Hamburg) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.3 qPCR/TaqMan

Die Quantifizierung der mRNA-Expression verschiedener Gene erfolgte mittels quantitativer Echtzeit-PCR (q RT-PCR) per SYBR-Green oder mittels TaqMan® (vgl. Tab. 3). Primer und Sonden (vgl. 2.1.2, Tab. 2) wurden nach Literaturangaben bestellt oder selbst entworfen. Die Effizienz aller Amplifikationen wurde vorab durch Verdünnungsreihen überprüft und lag zwischen 95% und 105%. In TaqMan® Experimenten wurde eine hausintern von transgenen E.coli hergestellte und aufgereinigte Taq-Polymerase (HK-Taq) eingesetzt. Der für SYBR-Experimente genutzte PerfeCta SYBR-Mix (Quanta BioSciences Inc., Gaithersburg, USA) ist eine kommerzielle Komplettlösung, die alle nötigen Komponenten bereits enthält.

Tab. 3: Zusammensetzung der qPCR-Ansätze für SYBR-Green und TaqMan® Experimente

¹ Quanta BioSciences Inc., Gaithersburg, USA

² Genaxxon bioscience GmbH, Ulm (vgl. 2.1.1 Tab.1)

³ Die Bestimmung von 18s rRNA mittels TaqMan erfolgte mit einem hoch-effizienten kommerziellen Primer-Sonde-Mix (#Mm03928990_g1; Applied Biosystems™ / Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA). Pro Ansatz müssen dabei nur 0,5 µl eingesetzt werden, wodurch die Wassermenge um 2,5 µl steigt.

Volumen SYBR Ansatz	Komponente	Konzentration	Volumen TaqMan® Ansatz
2 µl	cDNA		2 µl
0,4 µl	Primermix (fwd/rev)	je 10 mM	2 µl
-	Sonde	10 mM	1 µl
-	dNTP-Mix ²	20 mM	0,5 µl
-	10x HK-Puffer	10x	2 µl
7,6 µl	H ₂ O		12 -14,5 µl ³
-	HK-Taq	unbekannt	0,5 µl
10 µl	PerfeCta SYBR-Mix ¹	2x	-
20 µl	Gesamtvolumen		20 µl

Alle Amplifikationsreaktionen wurde im ‚StepOne Plus RT PCR‘ System (Applied Biosystems™ / Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA) mit folgenden Parametern durchgeführt: Initialdenaturierung bei 95°C für 5 min gefolgt von 45 Zyklen bestehend aus 15 sek Denaturierung bei 94°C und 60 sek Annealing und Elongation bei 60°C inklusive abschließender Messung. Für SYBR-Green-Ansätze wurde nach dem letzten PCR-Zyklus zusätzlich eine Schmelzkurven-Analyse zur Überprüfung der Produktqualität und Amplifikationsspezifität durchgeführt. Die Auswertung erfolgte relativ im Vergleich zur 18s rRNA Expression mit der 2^{-ΔΔct}-Methode genau nach Protokoll (Livak und Schmittgen 2001).

2.2.4 Proteinextraktion und Quantifizierung mittels BCA

Die Extraktion muriner hepatischer Protein wurde durch Homogenisierung von etwa 30 mg Lebergewebe in 1 ml RIPA-Puffer versetzt mit Proteinase-Inhibitor (vgl. 2.1.1, Tab. 1) im ‚Qiagen TissueLyser LT‘ (Qiagen GmbH, Hilden) für 4 min bei 50 Hz eingeleitet. Nachfolgend wurde zunächst durch 10-minütige Zentrifugation bei 3000 g der grobe Debris entfernt bevor durch Sonifikation für 30 sek bei 4°C im ‚Bioruptor® plus‘ (Diagenode s.a. Belgium, Serainge [Ougrée]) der Aufschluss abgeschlossen und die DNA gesichert wurde.

Die Quantifizierung wurde anschließend mit Hilfe des ‚Pierce™ BCA Protein Assay Kit‘ (#23255; Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA) mit 50x verdünnten Proben in Doppelwerten gegen eine Albumin-Standardreihe nach Herstellerangaben durchgeführt. Die zugrunde liegende photometrische Analyse der Absorption (562 nm) der Kupferkomplexbildenden Bicinchoninsäure (Smith *et al.* 1985) erfolgte an einem ‚TECAN Sunrise™ Remote‘ unter Verwendung der Software ‚Magellan™ V. 6.4‘ (Tecan Group Ltd. Männedorf, Schweiz).

2.2.5 Protein-Fällung

Anschließend wurden die Protein-Lösungen mittels Methanol-Chloroform-Fällung (Wessel und Flugge 1984) aufkonzentriert. Dafür wurden je 50 µg Protein mit Wasser auf 100 µl Gesamtvolumen verdünnt und anschließend mit 400 µl Methanol, 100 µl Chloroform und weiteren 300 µl Wasser gemischt. 5 min Zentrifugation bei 13.000 rpm führten zur Phasentrennung. Nach dem Abnehmen der oberen Phase wurden die in der Interphase gesammelten Proteine schließlich durch die Zugabe weiterer 300 µl Methanol gefolgt von starkem Mischen und 5 min Zentrifugation bei 13.000 rpm ausgefällt. Das Pellet wurde kurz luftgetrocknet und anschließend in 10 µl 1x Probenpuffer (vgl. 2.1.1, Tab. 1) aufgenommen.

2.2.6 SDS Page & Westernblot

Die Expressionsstärke einzelner hepatischer Proteine wurde mittels Immunoblot analysiert. Die nötige Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Masse wurde nach 5 min Denaturierung bei 95°C per SDS-Page in einem ‚PerfectBlue™ Twin ExW S‘- Elektrophorese-System (peqlab Biotechnologie GmbH / VWR Life Science Competence Center, Erlangen) durchgeführt. Das Einlaufen der Proben ins Sammelgel (4%, vgl. 2.1.1, Tab.1) zur Bildung einer geraden Lauffront erfolgte binnen 15 min bei 100 V. Die Separation im Trenngel (12%; vgl. 2.1.1, Tab.1) lief über 80 min bei konstant 35 mA. Als Vergleichsstandard diente der ‚Protein Marker VI (10-245) prestrained‘ der AppliChem GmbH (#A8889; Darmstadt).

Anschließend wurden die Proteine mittels Tankblot-Verfahren auf eine PVDF-Membran (0,45 µm Porengröße, Membrandicke 125 ± 25 µm; Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe) übertragen. Dafür wurde das SDS-Gel zunächst für 20 min in ‚Blottingpuffer‘ (vgl. 2.1.1, Tab.1) äquilibriert. Währenddessen wurde auch die Membran durch 10 sek Aktivierung in Methanol, ca. 5 min Waschen in Wasser und 15 min Schwenken in ‚Blottingpuffer‘ vorbehandelt. Der Transfer erfolgte eiskühlt bei konstant 200 mA binnen 2 h, wobei Gel und Membran beidseits von zwei ebenfalls mit Blottingpuffer getränkten Filterpapieren (MN827B, Dicke 0,7 mm, Dichte 270 g/m²; Macherey-Nagel, Düren) umschlossen waren. Anschließend wurde zunächst die Transfereffizienz durch 5 min Ponceau S-Färbung (vgl. 2.1.1, Tab.1) der Membran überprüft. Areale mit Proteinbanden relevanter Größe wurden anhand des Markers identifiziert und ausgeschnitten. Nach 10 min Entfärbung in Wasser und 5 min Waschen in TBS-T (vgl. 2.1.1, Tab. 1) wurden die Membranstreifen für 1 h bei RT zur Reduktion unspezifischer Antikörperreaktionen unter leichtem Schütteln in ‚Blockingpuffer‘ (vgl. 2.1.1, Tab.1) blockiert. Auch die Verdünnungen von Primär- und Sekundärantikörpern wurden mit Blocking-Puffer angesetzt. Die Inkubation mit den Primärantikörpern für Cyp2b10 (1:3000; polyklonal Kaninchen; #AB9916, Millipore Biosciences Research Reagents SBU Temecula USA / Merck KGaA Darmstadt) und die interne Kontrolle Gapdh (1:20.000; monoklonal Maus; #sc-32233, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas USA) erfolgte über Nacht bei 4°C. Vor Zugabe der von Sigma bezogenen Sekundärantikörper gegen Maus- (1:10.000; polyklonal Schaf; #A6782) bzw. Kaninchen-Antigene (1:5000; polyklonal Ziege; #A0545) wurden die Membranstreifen zur Entfernung von ungebundenem Primärantikörper zunächst dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen. Entsprechend wurde auch überschüssiger Sekundärantikörper nach 1 h bei RT entfernt. Die Detektion erfolgte mittels des Meerrettichperoxidase-assoziierten Chemilumineszenz Plus Systems ‚FemtoMax™-110‘ (Rockland Immunochemicals, Inc. Gilbertsville USA) nach 5 min Inkubation am ChemiDoc XRS System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) unter Verwendung der Software ‚Quantity One®‘ (V 4.6.9; Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Die abschließende Quantifizierung wurde relativ zur internen Kontrolle Gapdh mit Hilfe des Programms ‚Image Lab (V 4.1; Bio-Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt.

2.2.7 ELISA

Zur Analyse der Blutserum-Konzentrationen Knochenmetabolismus-assoziiertes Parameter wurden verschiedene kommerzielle ELISA-Systeme nach Herstellerangaben verwendet. Als Ausgangsmaterial diente murines Blutserum (vgl. 2.3.4). Die verwendeten Produkte sowie die jeweiligen Serumverdünnungen können Tabelle 4 entnommen werden.

Tab. 4: Verwendete kommerzielle ELISA-Systeme zur Analyse knochenspezifischer Serumparameter

Untersucht wurden die anabolen Faktoren P1NP (Prokollagen Type 1 N-terminales Propeptid) und Osteocalcin, der katabole Faktor CTX-1 (C-terminaler Kollagen Telopeptid) sowie das anabol wirksame Sexualhormon Testosteron (vgl. 3.2.2). Um Proben-Konzentrationen im Bereich der Standardreihen zu erhalten, musste das murine Serum für alle Analysen zunächst entweder mit PBS (vgl. 2.1.1, Tab. 1) oder mitgeliefertem 'Sample-Buffer' verdünnt werden. Die Auswertung erfolgte durch Abgleich mit internen Standardreihen nach logarithmischer (log) oder exponentieller (pot) Regression.

¹ Immunodiagnostic Systems Deutschland GmbH, Frankfurt a.M.

² Alfa Aesar / Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA

³ Abcam PLC; Cambridge, UK

Serumparameter	System / Hersteller	Eingesetzte Verdünnung	Regression
Osteocalcin	Mouse Osteocalcin Enzyme Immunoassay Kit AlfaAesar ² (#BT-470 / J65239)	1:10 in 'Sample Buffer'	log
P1NP	Rat/Mouse PINP EIA IDS ¹ (#AC-33F1)	1:10 in 'Sample Buffer'	pot
CTX	RatLaps™ (CTX-I) EIA IDS ¹ (#AC-06F1)	1:2 in PBS	log
Testosteron	Testosterone ELISA Kit Abcam ³ (#ab108666)	1:15 in PBS	log

Die Experimente wurden von Frau G.-A. (MTA, Institut für Pharmakologie) durchgeführt. Alle Messungen erfolgten an einem 'TECAN Sunrise™ Remote' unter Verwendung der Software 'Magellan™ V. 6.4' (Tecan Group Ltd. Männedorf, Schweiz). Die Auswertung beruht auf dem Vergleich zu logarithmischen oder exponentiellen Regressionen interner Standardreihen.

2.3 Tierversuche

Wildtyp C57BL/6 J Mäuse wurden von Charles River (Charles River Laboratories, Sulzfeld) oder Harlan (Envigo RMS GmbH, Venray Niederlande) bezogen, während Wildtyp CD1 Mäuse bei Janvier (Le Genest Saint Isle / Saint Berthevin, Frankreich) bestellt wurden. Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Experimente auf einem reinen C57BL/6 Hintergrund durchgeführt. Haltung und Zucht erfolgten im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz unter standardisierten Bedingungen bei 22°C in einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Zyklus in den Räumlichkeiten des Translational Animal Research Center (TARC) im Gebäude 905 der Universitätsmedizin oder im Neubau des TARC auf dem Campus der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Wasser sowie Futter (Ssniff® R/M-H Extrudat, #1536, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) standen den maximal in fünfer Gruppen gehaltenen Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die Reinigung der Käfige (26,7 x 20,7 x 14,0 cm) wurde zweimal wöchentlich durch ausgebildetes Personal des TARC vorgenommen. Alle Tiere erhielten eine Woche Akklimatisationszeit vor Beginn der Versuche. Die genaue Zuordnung der einzelnen Tiere wurde durch Ohrstanz-Markierungen gewährleistet. Alle Tierversuche waren beantragt und wurden am 24.10.2013 durch das Landesuntersuchungsamt Koblenz genehmigt (Aktenzeichen 23 177-07/G 13-1-078).

2.3.1 Geschlechtsbestimmung

Wenn möglich wurde die Geschlechtsbestimmung durch Sichtkontrolle anhand des anogenitalen Abstands vorgenommen. Bei C57BL/6 J Jungtieren konnte zusätzlich auf einen bei nur männlichen Tieren vorhandenen dunkler Pigmentfleck geachtet werden, welcher sich dort findet, wo später die Hoden einwachsen (vgl. A3 Abb. A 1).

Wenn wie bei CD1 Jundtieren keine sichere visuelle Identifizierung des Geschlechts möglich war, erfolgte ein molekularbiologischer Nachweis mittels PCR. Die dafür benötigte DNA wurde durch ein ‚HotSHOT‘-Verfahren (‚Hot Sodium Hydroxide and Tris) (Truett *et al.* 2000) aus den bei der Markierung anfallenden Ohrstanzen gewonnen. Zunächst wurden die Gewebeproben mit 75 µl ‚Base Solution‘ (1x; vgl. 2.1.1, Tab. 1) für 30 min bei 95°C inkubiert. Nach dem die Proben auf Eis auf 8-10°C abgekühlt waren, wurden 75 µl ‚Neutralization Solution‘ (1x; vgl. 2.1.1, Tab. 1) zugegeben bevor sie abschließend kurz kräftig gemischt wurden.

1 µl der durch dieses Schnellprotokoll isolierten DNA wurde daraufhin in einer von Lavrovsky *et al.* (1998) vorgeschlagenen Multiplex-PCR zur Geschlechtsbestimmung eingesetzt (vgl. Tab.5). Das Verfahren beruht auf einer Duplex-PCR, also zwei parallel verlaufenden Amplifikationen in einem Reaktionsgefäß. Eine Reaktion vervielfältigt einen Bereich der auf Chromosom 3 codierten und somit in beiden Geschlechtern vorhandenen β-Untereinheit von TSH (Thyreoida-stimulierendes Hormon) und dient als interne Kontrolle. Das zweite Produkt hingegen ist geschlechtsspezifisch, da es auf den Sry-Lokus auf dem männlichen Y-Chromosom zurückzuführen ist. Somit sind Mäuse deren DNA zwei Produkte liefert männlich, wohingegen solche mit nur einem Amplifikat weiblich sind.

Tab. 5: Zusammensetzung der PCR-Ansätze für die Multiplex-PCR zur Geschlechtsbestimmung

¹ peqlab Biotechnologie GmbH / VWR Life Science Competence Center, Erlangen

² Genaxxon bioscience GmbH, Ulm (vgl. 2.1.1 Tab.1)

Volumen	Komponente	Konzentration
1 µl	DNA	
20,5 µl	H ₂ O	
0,5 µl	Primermix (Tshb & Sry je fwd/rev)	je 10 mM
0,25 µl	dNTP-Mix ²	20 mM
2,5 µl	10x ‚Reaction Buffer S‘ ¹	10x
0,25 µl	peqGOLD Taq-DNA-Polymerase ¹	5 U/ µl
25 µl	Gesamtvolumen	

Die Reaktionen wurde im ‚Eppendorf Mastercycler® gradient‘ (Eppendorf AG, Hamburg) mit folgenden Parametern durchgeführt: Initialdenaturierung bei 94°C für 3 min gefolgt von 30

Zyklen bestehend aus 1 min Denaturierung bei 94°C, 30 sek Annealing bei 60°C und 20 sek Elongation bei 72°C und abschließender Endelongation bei 72°C für 10 min.

Die Auswertung wurde mittels Elektrophorese auf einem nicht-denaturierenden Agarosegel (2% Agarose in 1x TAE; vgl. 2.1.1, Tab. 1) durchgeführt (Laufbedingungen: 80 V für 60 min). Die Proben wurden entsprechend ihres Volumens mit 6x ‚DNA-Ladepuffer‘ (vgl. 2.1.1, Tab. 1) versetzt, was durch die enthaltene Saccharose zu einer Erhöhung der Dichte führt. Als Molekulargewichtsstandards dienten die ‚GeneRuler™ 50Bp DNA Ladder‘ (#SM0373, Fermentas / Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA) und die ‚100 Bp DNA Ladder‘ (N3231S, New England Biolabs GmbH Frankfurt a.M.). Das Anfärben des Gels erfolgte durch Zugabe von ‚Biotium GelRed™‘ (3 µL/100 ml) in die Agarose (Biotium, Inc. Fremont, USA). Zur Dokumentation wurde das Gel mit Hilfe des ‚ChemiDoc XRS System‘ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) unter UV-Belichtung fotografiert.

2.3.2 Zucht und Training von Zuchtböcken

Die Verpaarungen erfolgten in den Geschlechterverhältnissen (m/w) 1:1 oder 1:2 im Käfig des Bockes, um diesem territoriale Sicherheit zu geben. Da der Zyklus weiblicher Mäuse etwa vier Tage dauert (Caligioni 2009), wurden die Paare - wenn möglich - für mindestens diese Zeit gemeinsam gehalten. Tragende Weibchen wurden einige Tage vor der Geburt vereinzelt, um eine eindeutige Zuordnung von Mutter und Wurf zu gewährleisten. Die Jungtiere wurden im Alter von 21 Tagen nach Geschlechtern sortiert von der Mutter getrennt.

Zur Maximierung der Zuchterfolge bei Experimenten mit kurzen oder terminierten Verpaarungszeiten wurden die jungen Böcke vorab durch Testverpaarungen trainiert. Dafür wurden 8 Wochen alte männliche Tiere zunächst für drei Tage mit Weibchen zusammengesetzt. Nach einer zweitägigen Pause erfolgte eine weitere Trainingsverpaarung für drei oder vier Tage. Vor ihrem Einsatz im Experiment wurden die Böcke abschließend noch einmal für mindestens vier Tage separiert.

2.3.3 Injektion von Mäusen zur Induktion des Lebermetabolismus

Die Injektion der Tiere erfolgte Substanz- und Lösungsmittelabhängig intraperitoneal (i.p.) oder sub cutan (s.c.). Die verabreichten Substanzen, ihre Lösungsmittel, die genutzten Dosierungen sowie die Applikationsform sind nachfolgend bei den einzelnen Experimenten aufgeführt. Für adulte Mäuse wurden Omnifix®-F 1 ml Spritzen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) 0,4 x 19 mm Kanülen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) benutzt. Neugeborene Mäuse wurden mit 0,5 ml Omnican®50 Einmal-Insulinspritzen mit integrierter

0,3 x 8 mm Kanüle (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) injiziert. Das Applikationsvolumen wurde generell möglichst klein gewählt. Es schwankte bei adulten Mäusen zwischen 100 µl und 600 µl und konnte für Neugeborene in einem Bereich zwischen 15 µl und 40 µl gehalten werden. Bei Substanzen, welche in instabilen DMSO-Maiskeimöl-Emulsionen verabreicht werden mussten, wurde die Injektionslösung erst unmittelbar vor dem Spritzen durch heftiges Mischen aus 10% Substanz in DMSO und 90% Maiskeimöl hergestellt. Da DMSO in hohen Dosen teratogene Effekte in Nagern hervorrufen (Ferm und Carpenter 1967, Gaylord Chemical Company 2014) sowie Veränderungen von Histonmodifikationen und DNA-Methylierung bedingen kann (Iwatani *et al.* 2006, Radhakrishnan *et al.* 2008), wurde im späteren Projektverlauf wenn möglich auf den Zusatz von DMSO zum Maiskeimöl verzichtet. Für TCPOBOP wurde in diesem Zusammenhang ein Testexperiment durchgeführt (vgl. Anhang A3 A 2), welches anhand äquivalenter Cyp2b10-Induktionswerte die Eignung beider Lösungsmittel bestätigte.

Neben TCPOBOP wurden auch die humanmedizinisch relevanten Medikamente Phenobarbital, Phenytoin, und Carbamazepin hinsichtlich ihres Induktionspotentials untersucht. Dabei wurde eine alltagsnahe Applikation per os (p.o.) getestet, wofür Phenobarbital im Trinkwasser gelöst (0.05 % w/v) und Phenytoin ins Futter gemischt (500 ppm; Spezialanfertigung Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) wurde. In allen Experimenten wurde die erfolgreiche Induktion der Biotransformation kurz nach Applikation anhand der Cyp2b10 Expression getestet. Einen ersten Hinweis lieferte dabei häufig bereits die ausgeprägte Hepatomegalie, welche auf die CAR-vermittelte Anregung der Proliferation von Hepatozyten und endoplasmatischem Retikulum zur Bereitstellung ausreichend vieler Cyps zurückzuführen ist (Molnar *et al.* 2013). Zum Ausschluss von Gewichtsschwankungen wurde diese nicht allein anhand des Lebergewichts sondern, über den Quotient des Lebergewichts zum Körpergewicht untersucht (Blanco-Bose *et al.* 2008, Burger und Herdson 1966).

2.3.4 Töten und Entbluten von Mäusen

Alle Tiere wurden am Versuchsende tierschutzgerecht gemäß den Vorgaben der deutschen Tierschutzversuchstierverordnung (TierSchVersV; Anlage 2) möglichst stressfrei abgetötet. Adulte Mäuse wurden dabei im Allgemeinen durch Zervikale Dislokation, Jungtiere durch Dekapitation getötet.

Für die ELISA-gestützten Analysen (vgl. 2.2.7) und die Untersuchung der Blutfette (vgl. 2.4.1) wurden größere Blutserum-Mengen benötigt. Um ausreichende Volumina zu erhalten, wurden post mortem Entblutungen per Herzpunktion durchgeführt. Lediglich in diesen Fällen musste die Euthanasie adulter Tiere durch Ersticken in CO₂-Atmosphäre erfolgen, was der

Vorbeugung von Blutverlust durch Beschädigungen der Karotiden beim Genickbruch diente. Nach der CO₂-Exposition wurde zunächst anhand des Zwischenzehenreflexes auf Vitalität geprüft bevor der Thorax zügig eröffnet und das Blut durch Punktion der rechten Herzkammer gewonnen wurde.

Das Blut wurde für 90 - 120 min bei RT stehen gelassen, um die Gerinnung zu ermöglichen. Durch anschließende 15 min Zentrifugation bei 2000 g wurde das flüssige Serum von der verklumpten zellulären Fraktion getrennt und bei -80°C gelagert. Stark hämolytische Seren wurden in den Versuchen nicht verwendet.

2.3.5 Blutzuckermessung und Glukosetoleranztest

Auf Grund der möglichen generationsübergreifenden Effekte auf den Glukosestoffwechsel (vgl. 1.4) wurden im Projektverlauf auch basaler Blutzucker und Glukosetoleranz untersucht. Dabei galt es zu beachten, dass die Analysen vieler metabolischer Parameter und kolorimetrische Konzentrationsbestimmungen sowie einige serumbasierte ELISA-Systeme durch kürzlich aufgenommene Nahrung stark beeinflusst werden können. Entsprechend wurden die Versuche zum Energiemetabolismus an zuvor über Nacht (~16 h) gefasteten Mäusen durchgeführt, was unter anderem zu einer Minimierung der Variabilität der basalen Blutglukoselevel führen soll (Ayala *et al.* 2010).

Alle Blutglukosemessungen erfolgten mit dem CONTOUR® XT Blutzuckermessgerät (Ascensia Diabetes Care Deutschland GmbH / Bayer AG, Leverkusen) und den zugehörigen originalen CONTOUR® NEXT Sensoren (Ascensia Diabetes Care Deutschland GmbH / Bayer AG, Leverkusen). Die wenigen benötigten µl Vollblut wurde durch Kappen der Schwanzspitze (~2-3 mm) gewonnen. Nachdem der erste Blutstropfen verworfen wurde, erfolgte die Messung gemäß der Herstellerangaben des CONTOUR®-Systems in Doppelwerten.

Neben der Bestimmung basaler Blutglukose wurden auch Glukosetoleranztests (GTT) mit dem CONTOUR®-System durchgeführt. Diese betrafen C57BL/6 J-Mäuse, welche vorab für 9 Wochen mit einer hochkalorischen Spezialdiät (HFD; DIO - 60 kJ% fat [Lard], #E15742-34 Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) oder der entsprechenden Kontrolldiät (SD; DIO - 10 kJ% fat, 11% sucrose „H“, #E15748-04 Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) gefüttert worden waren. Für den GTT wurde ebenfalls zunächst die Basalglukose nach Fasten bestimmt. Unmittelbar danach wurde den Mäusen ein einmaliger Bolus Glukoselösung (G-10%, Glucose 10% Injektionslösung, Mini-Plasco® Connect B. Braun Melsungen AG, Melsungen) intraperitoneal verabreicht. Das für die Dosis von 2 g/kg benötigte Bolus-Volumen wurde dabei zwecks Vergleichbarkeit - einheitlich für alle Mäuse - anhand des geschlechtsspezifischen Durchschnittsgewichts der mit Kontrolldiät gefütterten Tiere festgelegt. Das individuelle

Gewicht konnte nicht zur Berechnung genutzt werden, da Tiere unter hochkalorischer Diät vor allem Körperfett zugewinnen ohne wesentliche Veränderungen der Masseanteile im Glukosemetabolismus aktiver Gewebe wie Leber, Muskel oder Hirn (Ayala *et al.* 2010). Zur Ermittlung der Glukosetoleranz wurden der auf die Injektion folgende Anstieg sowie die anschließende stoffwechselfermittelte Abnahme der Glukosekonzentration über einen Zeitrahmen von 2 h durch weitere Messungen nach 15, 30, 60 und 120 min beobachtet (Ayala *et al.* 2010, Gao *et al.* 2009). Das benötigte Blut konnte während des ganzen Versuchs aus der Schwanzspitze gewonnen werden; wenn nötig nach vorsichtiger mechanischer Wundöffnung. Zur Vermeidung stressinduzierter Schwankungen wurden die Tiere während des ganzen Experiments nicht fixiert. Sie waren zumeist freilaufend in Einzelkäfigen oder wurden locker am Schwanz gehalten.

2.3.6 Zoxazolamin-Paralyse-Versuch

Zur Analyse möglicher phänotypischer Konsequenzen hinsichtlich der Kapazität des Fremdstoffmetabolismus, resultierend aus der generationsübergreifenden Induktion von Cyp2b10 nach TCPOBOP Exposition, wurden medikamentös-induzierte Paralyse-Versuche mit dem Muskelrelaxanz Zoxazolamin durchgeführt. Da Zoxazolamin ein Cyp-Substrat ist, kann die Dauer der Paralyse ausgelöst durch eine fixe Dosis als Indikator für Cyp-Aktivität genutzt werden (Chen *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2004).

Für die Versuche erhielten neun Wochen alte adulte Weibchen eine Injektion (i.p.) mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder dem Lösungsmittel Maiskeimöl und wurden eine Woche danach mit unbehandelten Böcken verpaart. F₁ Tiere beider Geschlechter wurden im Alter von 9 Wochen der Zoxazolamin-Paralyse unterzogen. Parallel wurden auch die F₀ Weibchen untersucht. Die Paralyse wurde durch intraperitoneale Injektion von Zoxazolamin (175 mg/kg) gelöst in DMSO/Maiskeimöl (10/90) initiiert und setzte in der Regel etwa 5-10 min danach ein. Tiere bei denen die Paralyse nach mehr als 20 min nicht eingetreten war wurden vom Versuch ausgeschlossen. Die Dauer der Paralyse wurde auf die Zeit festgelegt, die die Mäuse benötigten, um sich selbstständig aus einer Rückenlage aufzurichten. Die Versuche erfolgten gebettet auf Einstreu aus den Käfigen in einem gut belüfteten Inkubator bei konstant 24°C, um dem Auskühlen der bewegungsunfähigen Tiere vorzubeugen. Um das Austrocknen der während der Paralyse geöffneten Augen zu verhindern, wurden diese mit Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Bayer Vital GmbH/ Bayer AG, Leverkusen) befeuchtet.

2.3.7 Untersuchungen zur Übertragung durch die männliche Keimbahn

Frau Dr. Marianne Mathäs konnte im Rahmen ihrer Doktorarbeit (2014) lediglich eine Übertragung innerhalb der weiblichen Linie nachweisen (vgl. 1.7). Parallel durchgeführte Versuche nach Exposition von Böcken zeigten keine Übertragung durch die männliche Keimbahn. Da jedoch die Spermatogenese ein komplexer Prozess mit zahlreichen verschiedenen Entwicklungsstadien ist (vgl. Abb. 5), wäre es möglich, dass durch den von Frau Dr. Mathäs gewählten Verpaarungszeitpunkt lediglich das Xenobiotika-sensitive Fenster verpasst wurde. Um dies auszuschließen, wurden adulte trainierte Böcke mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder dem Lösungsmittel DMSO/Maiskeimöl (10/90) intraperitoneal injiziert und anschließend 3, 19 und 31 Tage später mit unbehandelten Weibchen verpaart. Abhängig vom Zeitpunkt der Verpaarung wurden somit Spermien zur Befruchtung genutzt, die sich bei der Exposition in unterschiedlichen Stadien der Spermatogenese befanden (vgl. Abb. 5). Die hepatische Cyp2b10 Expression der zeitpunktspezifischen F₁ Generationen wurde am sechsten Lebenstag auf eine Transmission über die männliche Keimbahn untersucht. Als Kontrolle für die erfolgreiche Induktion der F₀ Generation wurde zusätzlich die hepatische Cyp2b10 Expression der Böcke nach der letzten Verpaarung ermittelt. (Die Cyp2b10-TaqMan-Analysen wurden von T. G. im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt).

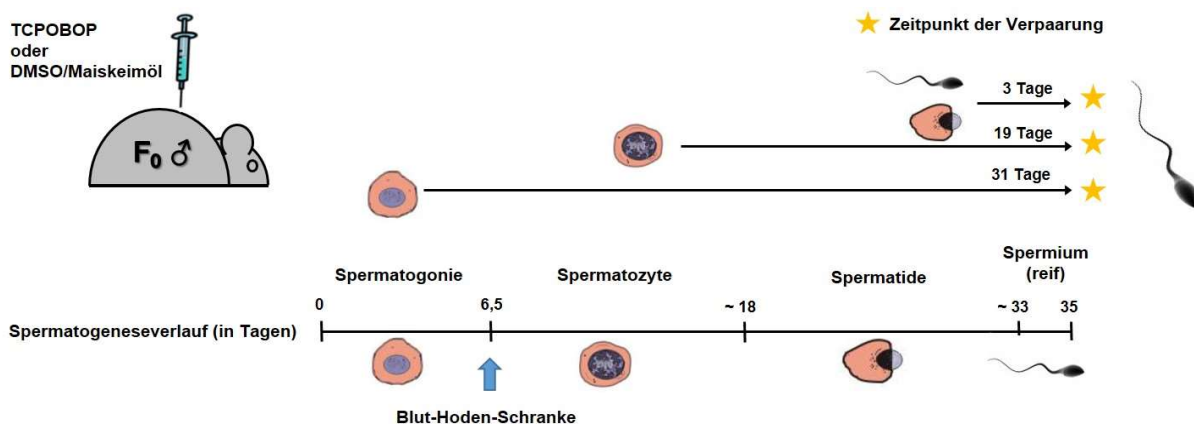


Abb. 5: Schematische Darstellung der murinen Spermatogenese und des experimentellen Designs zur Untersuchung aller Keimbahnstadien

Die am Tag der Geburt einsetzende murine Spermatogenese dauert 35 Tage, lässt sich in 4 Hauptstadien unterteilen und verläuft als kontinuierlicher Prozess, so dass nach der ersten vollständigen Reifung jederzeit alle Spermatogenese-Entwicklungsstadien im Organismus vorhanden sind. Zum Zeitpunkt der Geburt beginnt die Differenzierung der Gonozyten (Urkeimzellen) zu spermatogonischen Stammzellen (Spermatogonien, SSCs). Nach ca. 6,5 Tagen mitotischen Teilungen und Zellvergrößerung gehen daraus Spermatozyten (SPCs) hervor, welche bereits durch die Blut-Hoden-Schranke vor vielen äußeren Einflüssen geschützt werden. Die diploiden Spermatozyten durchlaufen beide meiotischen Reifeteilungen, wodurch etwa 18 Tage nach der Geburt haploide Spermatische entstehen. Diese sind zunächst rund (RS), differenzieren aber im weiteren Verlauf der Spermatogenese zu elongierten Spermatischen (ES) und schließlich nach etwa 33 Tagen zu reifen Spermien (Dass *et al.* 2007, Holland und Rakyan 2013). Um alle vier Keimzellstadien hinsichtlich ihres Induktions- und Transmissionspotentials zu untersuchen wurden adulte trainierte C57BL/6 Böcke mit TCPOBOP (3mg/kg) oder dem Lösungsmittel DMSO/Maiskeimöl (10/90) behandelt und 3, 19 und 31 Tage danach mit unbehandelten Weibchen verpaart. Abhängig vom Zeitpunkt der Verpaarung wurden somit Spermien zur Befruchtung genutzt die sich bei der Exposition in unterschiedlichen Stadien der Spermatogenese befanden.

2.3.8 Embryotransfer und in-vitro Fertilisation

Zur genaueren mechanistischen Charakterisierung der von Frau Dr. Marianne Mathäs beobachteten Transmission in der weiblichen Linie (vgl. 1.7) wurden in-vitro-Fertilisationen (IVF) und Embryotransfer-Experimente (ET) durchgeführt, da einzig diese komplexen Untersuchungen eine klare Differenzierung zwischen präkonzeptionellen epigenetischen Veränderungen auf Keimzellebene und postkonzeptionellen Effekten durch intrauterine oder postnatale Exposition erlauben (Francis *et al.* 2003, Toth 2015). Weil beide Verfahren veterinärmedizinischer Betreuung bedürfen wurden sie vom Fachpersonal des TARC durchgeführt.

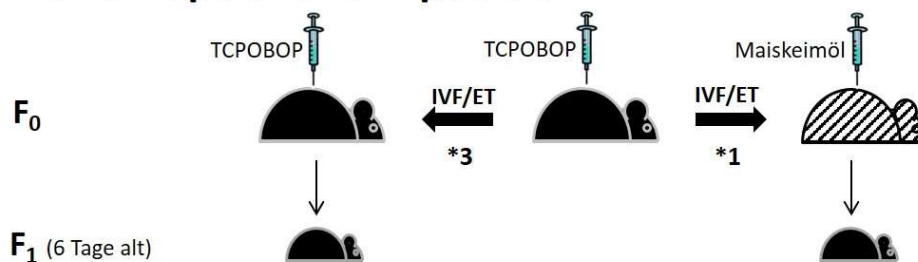
Für die in-vitro-Fertilisationen (schematische Darstellung vgl. Anhang A3 A 3) wurden drei Tage alte weibliche C57BL/6 Mäuse, die als Spendermütter dienen sollten, mit TCPOBOP (3 mg/kg, i.p.) oder Lösungsmittel (DMSO/Maiskeimöl [10/90]) behandelt. Zweieinhalb Wochen später (21 Tage alt) wurde durch Injektion von PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin; 2,5-5 IU; i.p.) und hCG (human Chorion Gonadotropin; 2,5 IU; i.p.) in steriler physiologischer Kochsalz-Injektionslösung im Abstand von 48 h eine Superovulation eingeleitet, bevor 13 h später die Eizellen gewonnen wurden. Dafür wurden die Tiere getötet und Ovarien, Ovidukte sowie Teile des Uterus heraus präpariert, um unter mikroskopischer Kontrolle die Cumulus-Oozyten-Komplexe durch Ruptur der Eileiterampullen zu isolieren. Parallel erfolgte die Spermengewinnung aus drei bis sechs Monate alten Böcken, deren Nebenhoden (Cauda Epididymis) und Samenleiter (Vas Deferens) postmortal präpariert und in 500 µl Cook MVF Medium (Cook Medical Inc., Bloomington USA) eröffnet wurden, so dass die Spermien während der nachfolgenden Inkubation (10 min, 37°C) ausschimmen konnten. Für die eigentliche in-vitro-Fertilisation wurden anschließend 2-5 Cumulus-Oozyten-Komplexe und 5 µl Sperma-Suspension ($\sim 2 \cdot 10^6$ Spermien pro ml) in 500 µl Cook K-RVFE-50 Medium (Cook Medical Inc., Bloomington USA) bei 37°C und stabilen pH-Bedingungen für 4-6 h inkubiert. Die resultierenden Zygoten wurden mehrfach gewaschen, aufgeteilt (~ 100 Zellen in 150 µl Medium) und über Nacht bei 37°C kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die lebensfähigen 2-Zell-Embryonen isoliert und operativ (unter Narkose), durch transiente Auslagerung von Uterus und Ovidukt, in die Eileiter von Tag 0,5 scheinsschwangeren Leihmüttern eingebracht (20 - 26 pro Amme) [Protokoll modifiziert nach: (Nakagata 2014, Schenkel 2006)]. Die Narkose erfolgte durch eine sogenannte ‚3er Kombination‘ (i.p.) aus Medetomidin (0,5 µg/g), Midazolam (5 µg/g) und Fentanyl (0,05 µg/g). Die post-operative Analgesie wurde durch Metamizoltropfen (500 mg/ml; 100 µg/g p.o.) und Carprofen (4,5 µg/g s.c.) gewährleistet.

Als Leihmütter wurden auf Grund ihrer besseren Reproduktionseigenschaften (vgl. Tab. 9) CD1 Weibchen verwendet, welche bereits eine Woche vor dem Transfer im Alter von neun

Wochen mit TCPOBOP oder DMSO/Maiskeimöl behandelt worden waren. Die Scheinschwangerschaften wurden parallel zur in-vitro-Fertilisation durch Verpaarung mit trainierten vasktomierten Böcken initiiert. Die Vasektomie der Männchen erfolgte im Alter von 5-6 Wochen durch Skrotumschnitt und Durchtrennung der Samenstränge mittels Kauter unter Narkose.

Die Embryotransfers erfolgten nach einem vergleichbaren Protokoll. Die Spendermütter wurden im Alter von 7 Tagen zunächst mit TCPOBOP oder Maiskeimöl und 3 - 4 Wochen später zur Superovulation mit PMSG und hCG behandelt. Unmittelbar nach der hCG Applikation wurden sie terminiert für 12 h mit trainierten fruchtbaren Böcken verpaart. Am nächsten Tag (1,0) wurden postmortal Zygoten aus den Eileiterampullen isoliert, kultiviert und als 2-Zell-Embryonen in Ammen transferiert (Nakagata 2014, Schenkel 2006).

Präkonzeptionelle Exposition



Postkonzeptionelle / Intrauterine Exposition

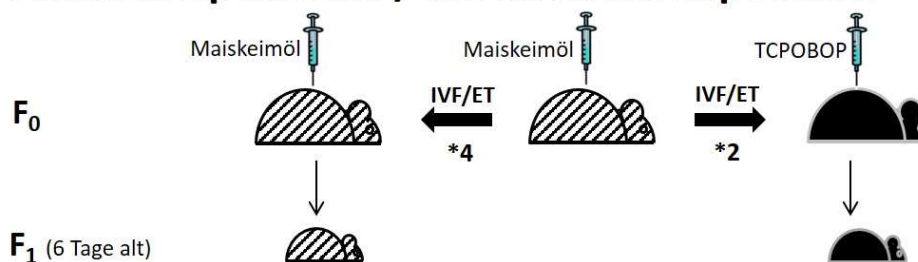


Abb. 6: Struktur und hypothetische Resultate der in-vitro-Fertilisations- und Embryotransferexperimente
Zur Prüfung eines präkonzeptionellen Effekts (obere Hälfte) wurden Embryonen induzierter Weibchen in nicht-induzierte Leihmütter (*1) übertragen. Der reziproke Ansatz (untere Hälfte) hingegen ermöglicht potentiell den Nachweis postkonzeptioneller/intrauteriner Effekte (*2). Die hormonelle Induktion der Superovulation sowie Narkose und schmerztherapeutische Behandlung der Leihmütter nach dem Transfer erforderten darüber hinaus die Realisierung von Kontrollgruppen zum Ausschluss methodisch bedingter Effekte. Zu diesem Zweck wurden analog auch Embryonen von Spendermüttern in identisch vorbehandelte Leihmütter transferiert (*3 und *4). Sollten die Neugeborenen der ersten Testgruppe (*1) einen veränderten Expressionsstatus für Cyp2b10 aufweisen wäre dies ein Hinweis für präkonzeptionelle Modifikationen. Eine Induktion des Gens in den Nachkommen nicht-induzierter Spendermütter, ausgetragen von induzierten Leihmüttern (*2) hingegen, würde intrauterine Effekte bestätigen.

Die Abgrenzung zwischen präkonzeptionellen epigenetischen Veränderungen auf Keimzellebene und postkonzeptionellen Effekten durch intrauterine oder postnatale Exposition wurde bei beiden experimentellen Vorgehensweisen durch Transfers zwischen reziprok vorbehandelten Spendermüttern und Ammen ermöglicht (vgl. Abb. 6). Um methodisch bedingte Effekte durch die hormonelle Induktion der Superovulation, die Narkose oder die

post-operative analgetische Behandlung ausschließen zu können, wurden ergänzend nicht-reziproke Transfers als Kontrollen durchgeführt. Die Nachkommen aller Transfers wurden am sechsten Lebenstag zur eindeutigen Differenzierung hinsichtlich ihrer hepatischen Cyp2b10 Expression untersucht.

2.3.9 Untersuchungen zur Übertragung durch die Muttermilch

Um festzustellen, ob die TCPOBOP-vermittelten generationsübergreifenden Effekte möglicherweise auf eine direkte Exposition mit der lipophilen Substanz durch die Muttermilch zurückzuführen sind, wurden Fremdpflegeversuche durchgeführt (Daxinger und Whitelaw 2012, Francis *et al.* 2003). Auch in diesen Experimenten dienten CD1 Mäuse auf Grund der besseren Brutpflegeeigenschaften und des geringeren Kronismus-Risikos als Ammen (vgl. Tab. 9). Weibliche C57BL/6 und CD1 Mäuse wurden mit TCPOBOP (3 mg/kg, i.p.) oder dem Lösungsmittel Maiskeimöl behandelt und eine Woche danach mit fertilen trainierten Böcken des gleichen Mausstamms über Nacht terminiert für 12 h verpaart. Schwangerschaften wurden anhand von Vaginalpfropfen am Morgen nach der Verpaarung und durch Palpation am Tag E15 bestätigt (Middaugh *et al.* 1975, Schenkel 2006). Da neugeborene Mäuse unmittelbar nach der Geburt erstmals gesäugt werden und dies die Messergebnisse beeinflussen könnte, musste die Entbindung der C57BL/6 Mütter kurz vor der natürlichen Geburt manuell per Kaiserschnitt erfolgen. Ausgehend von der durchschnittlichen Tragzeit von C57BL/6 Mäusen [19,5 Tage; (Murray *et al.* 2010)] wurden die Kaiserschnitte am Schwangerschaftstag E19, unmittelbar nach dem Abtöten der Mutter durch zervikale Dislokation, durchgeführt. Die per Kaiserschnitt geborenen Jungtiere wurden zunächst unter Rotlicht auf einem Tuch abgetrocknet, wobei ihr Kreislauf durch vorsichtiges Rollen und Anstupsen angeregt wurde (Nakagata 2014). Anschließend wurden sie zur Geruchsübertragung mit Einstreu aus dem Käfig der Amme bestreut und deren Nesttuch abgerieben, bevor sie unter den maximal 24 h alten natürlich geborenen Wurf der CD1 Maus gemischt wurden. Um den Geruch des Wurfes dabei nicht komplett zu verändern und das Kronismus-Risiko zu reduzieren, wurde die für die Maus relevante Gesamtzahl an Jungtieren beibehalten und nur ca. 50% des Wurfes ausgetauscht. Nach erfolgreichem Transfer wurden somit die untergeschobenen Babys gemeinsam mit einigen verbliebenen Nachkommen der Amme für sechs Tage gesäugt. Neben reziproken Transfers von nicht-induzierten Müttern zu induzierten Ammen und umgekehrt wurden auch in diesem Experiment nicht-reziproke Kontrollen mitgeführt. Die Möglichkeit einer Muttermilch-vermittelten Übertragung von TCPOBOP wurde an Tag 6 anhand der hepatischen Cyp2b10 Expression der verschiedenen Transfergruppen und des Vergleichs zu den parallel gesäugten CD1 Nachkommen untersucht.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Analyse von Blut-Serum-Lipiden per HPLC-Größenausschluss-Chromatographie

Zur Untersuchung möglicher generationsübergreifender Effekte auf den Energiestoffwechsel (vgl. 1.4) wurden unter anderem Cholesterin-Lipoprotein-Profile mittels Größenausschlusschromatographie von Prof. Dr. E. B. am Institut für experimentelle Biomedizin des Universitätsklinikums Würzburg angefertigt. Der Transport der Serumproben (vgl. 2.3.4) erfolgte bei Tiefkälte auf Trockeneis.

Für die HPLC-Größenausschlusschromatographie wurden zunächst je 5 µl Serum unter Verwendung einer ‚Superose 6 3.2/300-Gelfiltrationssäule‘ (GE Healthcare, Uppsala Schweden) fraktioniert, wobei PBS (pH 7,4) als Elutionspuffer durch eine ‚1525 Binary HPLC Pumpe‘ (Waters GmbH, Eschborn) mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 50 µl/min zugeführt wurde. Die separierten Lipoproteine wurden in einem T-Rohr mit Cholesterin-Reagenz vermischt (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), welches durch eine ‚1515 Isocratic HPLC Pumpe‘ transportiert wurde (50 µl/min). Anschließend wurde das Gemisch zunächst innerhalb des ‚Temperature Control Module II‘ (Waters GmbH, Eschborn) bei 37°C durch eine 500 µl PEEK-Reaktionsspule (Innendurchmesser 0,75 mm) geleitet, bevor die Absorption mit einem UV-VIS-Detektor (#2489, Waters GmbH, Eschborn) bei 500 nm gemessen wurde. Die Gesamtlaufzeit für jede Probe betrug 60 min. Die resultierenden Chromatogramme wurden unter Verwendung der Software Empower 3 (Waters GmbH, Eschborn) integriert und die Konzentrationen von VLDL, LDL und HDL anhand ihres prozentualen Flächenanteils des per UV-Absorption ermittelten Gesamtcholesterins berechnet (vgl. A3 Abb. A 4).

2.4.2 Extraktion von TCPOBOP aus murinem Fettgewebe und Detektion mittels HPLC-MS

Ergänzend zu den anderen Untersuchungen zur mechanistischen Charakterisierung der Transmission in der weiblichen Linie wurde ein direkter Nachweis von TCPOBOP in murinem Fettgewebe mittels HPLC-Massenspektrometrie (HPLC-MS) durchgeführt. Dafür war zunächst eine Extraktion von TCPOBOP aus der für Messungen ungeeigneten Fettmatrix nötig (Protokoll modifiziert nach ‚J.T. Baker Application Note EN-001 - Extraction of Pesticides and PCBs from Adipose Tissue‘).

Im ersten Schritt wurden ca. 300 mg abdominales Fettgewebe für 30 min bei 60°C im Becherglas auf einer Heizplatte ausgelassen. 120 µl des flüssigen klaren Fetts wurden danach

in 5 ml n-Hexan getropft, bevor das Gemisch für 5 min im Wasserbad auf 50°C erhitzt, im noch heißen Zustand durch schütteln gemischt und anschließend zur Präzipitation des Fetts über Nacht bei -20°C gelagert wurde. Das ausgefallene Fett wurde durch Zentrifugation bei -15°C (2000g, 5 min) pelletiert und der TCPOBOP-haltige Hexan-Überstand in ein neues 5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer weiteren Kältepräzipitation für drei Nächte wurden nach dem Pelletieren des ausgefallenen Fetts zunächst 4 ml des Hexanextrakts abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß erneut für 5 min bei -15°C zentrifugiert (2000g). 1 ml des resultierenden Hexanextrakts wurde daraufhin unter Stickstoffkühlung für 1,5 h eingeeengt. Der zurückbleibende ölige Tropfen wurde für eine zweite Extraktion in 100 µl Acetonitril (50%) aufgenommen zweimal durch starkes Schütteln und 10-minütige Rotation (50 rpm) im ‚Intelli-Mixer‘ Rollmischer (neoLab Migge GmbH, Heidelberg) bei RT gemischt. Nach Zentrifugation (13000g, 2 min) bildete das verbliebene Fett eine oberliegende Phase, welche durch kurze Lagerung bei -20°C fest wurde und zur Entnahme von 50 µl Acetonitril-Extrakt leicht mit der Pipette durchstoßen werden konnte.

Die HPLC-MS/MS Analysen wurden von Dr. M. M. (Institut für Molekulare Biologie Mainz) durchgeführt. Je 5 µl Extrakt wurden bei 30°C auf einer ‚ZORBAX RRHD SB-C18‘ Säule (1.8-µm 2.1 × 50 mm) in einem ‚Agilent 1290 UHPLC System‘ (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn) aufgetrennt. Als Laufpuffer dienten 5mM Ammoniumacetat (pH 6,9) und Acetonitril bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 0,4 ml/min unter Verwendung des folgenden Gradienten: 50% Acetonitril (ACN) für 2 min gefolgt von einem linearen Anstieg auf 95% ACN innerhalb von 3 min und konstant 95% ACN für weitere 2 min. Zur Rekonditionierung wurde die Laufgeschwindigkeit auf 0.5 ml/min erhöht und die Säule für 3 min mit 50% ACN gewaschen, wobei innerhalb der dritten Minute die Geschwindigkeit linear auf 0,4 ml/min reduziert wurde. Die Detektion erfolgte mit einem ‚Agilent 6090 Triple Quadruple MS System‘ (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn) unter Verwendung der in Tab. 6 zusammengefassten Einstellungen. Die Daten wurde mit der Software ‚MassHunter (Version B.05.02; Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn) analysiert, wobei die natürlichen Chlor-Isotope (³⁵Cl und ³⁷Cl) zur Validierung der Peak-Identität genutzt wurden. Der Vergleich mit einer Standardreihe aus unbehandelten Fettproben, versetzt mit definiertem Mengen TCPOBOP und mit einer Verdünnungsreihe von TCPOBOP in 50% ACN, ermöglichte die Quantifizierung der Proben.

Tab. 6: Einstellungen des Agilent 6490 Triple Quadrupole MS Systems

Standard-Parameter	
Ionen Modus	positiv
Gastemperatur	110 °C
Gasstrom	19 L/min
Zerstäuberdruck	25 psi
„Sheath“-Gastemperatur	375 °C
„Sheath“-Gasstrom	11 L/min
Kapillare Spannung	2000 V
Spannung Zerstäuberdüse	0 V
iFunnel Parameter	
Spannung Hochdruck RF (region funnel)	150 V
Spannung Niedrigdruck RF (region funnel)	60 V

2.5 Radiologische Methoden / Molekulare Bildgebung

Zur Untersuchung möglicher generationsübergreifender Effekte auf den Knochenmetabolismus (vgl. 1.4) wurden neben assoziierten Serumwerten (vgl. 2.2.7) auch Knochenmineraldichte (BMD) und Strukturparameter mittels Mikro-Computertomographie (Mikro-CT) durch T. D. (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel/Molecular Imaging North Competence Center [MOIN CC]) gemessen.

Untersucht wurden drei Gruppen männlicher F₀ Tiere (1. TCPOBOP 3 mg/kg einmalig, 2. Maiskeimöl einmalig, 3. TCPOBOP 0,5 mg/kg wöchentlich) zwölf Wochen nach der (ersten) Exposition sowie zwölf Wochen alte männliche Nachkommen (F₁) weiblicher Mäuse, welchen eine Woche vor Verpaarung mit unbehandelten Böcken TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl injiziert worden waren. Für die Analysen wurden pro Maus beide Schienbeine (Tibien) und zwei Lendenwirbel (Vertebrae) manuell vom umliegenden Gewebe befreit und in 70% Ethanol bei RT und vor Licht geschützt nach Kiel transportiert. Dort erfolgten die Scans ex vivo mit einem „SCANCO vivaCT 80“ (SCANCO Medical AG, Brüttisellen Schweiz) unter Verwendung der SCANCO Software Suite (V. 6.5-3; SCANCO Medical AG, Brüttisellen Schweiz), wobei für Tibien und Lendenwirbel leicht abweichende Protokolle (vgl. Tab. 7) genutzt wurden.

Tab. 7: Einstellungen des SCANCO vivaCT 80 für die Micro-CT-Scans von Tibien und Vertebrae

	Tibiae	Vertebrae
CF	CF	CF
Auflösung	15,6	10,0
Voxel pro Ebene	2048x2048	3072x3072
FOV (Bildausschnitt, ‚field of view‘)	32mm	32mm
kVp (angelegte Röhrenspannung)	70	70
Integrationszeit	300ms	300ms
Projektionen pro Schicht	1000	1500

Für die weiteren Analysen der UHQ-Datensätze („ultra high quality“) wurde das Programm StructuralInsight (V. 3.1.6.1, Sektion Biomedizinische Bildgebung, UKSH, Kiel, Germany) genutzt. Die vorab nötige Segmentierung erfolgte automatisch und Schwellenwert-basiert (500 mgHA/cm^3). Während zur Festlegung des diaphysären Kortex der Tibien einfach die mittleren 20% der individuellen Länge der Knochen genutzt werden konnten (vgl. Abb. 10B), musste zur Unterscheidung von kortikalen und trabekulären Regionen der Wirbel eine sogenannte „Closing-Operation“ durchgeführt werden. Dafür wurden zunächst alle über den Schwellenwert definierten Bereiche um $150 \mu\text{m}$ ausgedehnt bevor der Prozess - ausgehend von allen verbliebenen Hohlräumen - umgekehrt wurde. Auf diese Art verschwinden kleine Hohlräume, was die Schärfe der Trennung zwischen kompaktem kortikalem Knochen und der hohlraumreichen Spongiosa verbessert. Der Kortex wurde daraufhin auf die äußeren $100 \mu\text{m}$ festgelegt, was den eigentlichen kortikalen Knochen und einen dünnen Bereich Spongiosa (Subkortex) einschließt (vgl. Abb. 9B). Diese Sicherheitszone gewährleistet die Qualität des trabekulären Segments. Für die quantitativen Analysen wurde der Schwellenwert auf 800 mgHA/cm^3 festgelegt. In beiden kortikalen Segmenten wurden neben der Knochenmineraldichte (BMD) auch die spezifische Dichte des mineralisierten Gewebes (TMD) sowie die kortikale Dicke (Ct.Th) und der Knochen-Volumen-Anteil (BV/TV) bestimmt. Für den trabekulären Bereich hingegen wurden neben BMD, TMD und BV/TV die durchschnittliche trabekuläre Dicke (Tb.Th) sowie der mittlere Freiraum zwischen den Trabekeln (Tb.Sp) ermittelt.

2.6 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit GraphPad Prism 5 (Version 5.04 Graphpad, San Diego USA) durchgeführt. Die jeweilig verwendeten statistischen Untersuchungen sind zusammen mit den einzelnen Ergebnissen beschrieben.

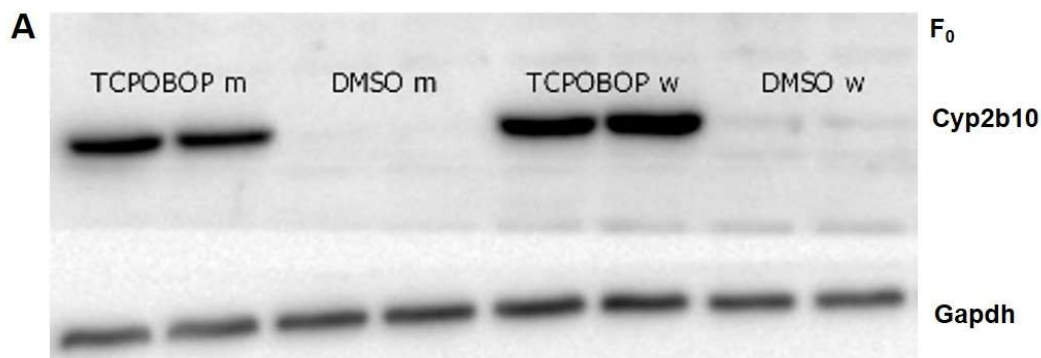
3 Ergebnisse

Die durch Fremdstoffkontakt ausgelöste Transmission einer anhaltenden Induktion von CAR Zielgenen, wie sie für Cyp2b10 von Frau Dr. Marianne Mathäs im Rahmen ihrer Promotion (Mathäs 2014) gezeigt wurde, könnte weitreichende Folgen für die Gesundheit exponierter Individuen und ihrer Nachkommen haben. Die im Folgenden beschriebenen Versuche sollten entsprechend mögliche phänotypische Konsequenzen sowie den der Transmission zu Grunde liegenden Mechanismus aufklären und das Potential einiger humanmedizinisch relevanter Substanzen vergleichbare Effekte hervorzurufen überprüfen.

3.1 Validierung auf Proteinebene

Die von Frau Dr. Marianne Mathäs erarbeiteten Daten zur Verlängerung und Vererbung des Cyp2b10-Induktionsstatus nach TCPOBOP Exposition beruhen auf mRNA-Analysen (vgl. 1.7). Um potentiell phänotypische Konsequenzen hervorrufen zu können, müssen die Expressionsänderungen auch in der biologisch aktiven Form - also auf Proteinebene - vorhanden und somit nachweisbar sein. Die entsprechende Validierung der mRNA-Ergebnisse erfolgte mittels Westernblot (vgl. 2.2.4 ff.) und wurde für eine möglichst gute Vergleichbarkeit mit asservierten Leberproben derselben Tiere durchgeführt.

Wie die TaqMan-Resultate (vgl. 1.7) zeigen auch die Westernblots eine massive Induktion von Cyp2b10 sowohl in F₀-Tieren drei Monate nach der TCPOBOP-Injektion (vgl. Abb. 7A) als auch in 6 Tage alten Nachkommen von präkonzeptionell exponierten Weibchen (vgl. Abb. 7B). Die relativen Ergebnisse der Quantifizierung der Westernblots (vgl. Abb. 7C) entsprechen weitestgehend den von Frau Dr. Mathäs per qPCR ermittelten Verhältnissen der Versuchsgruppen zueinander. Allerdings liegen die absoluten Induktionswerte aller Gruppen auf Grund der methodisch geringeren Sensitivität der Westernblot-Quantifizierung um den Faktor 10 - 100 niedriger als bei den mRNA-Messungen.



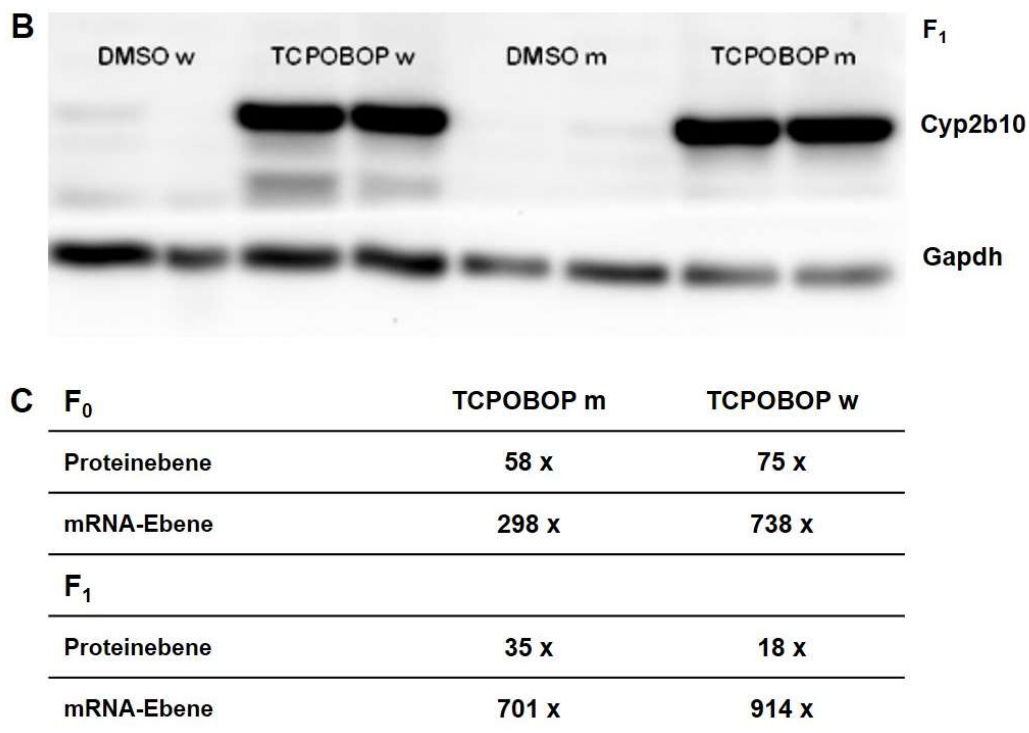


Abb. 7: Validierung der mRNA-Daten von Frau Dr. Marianne Mathäs auf Proteinebene mittels Westernblot
 Die Resultate der mRNA-basierenden Analysen von Frau Dr. Marianne Mathäs wurden mittels Westernblot auf Proteinebene überprüft. Es wurden pro Tier 50 µg hepatische Proteine auf einem 12%igen SDS Gel aufgetrennt und im Tankblot-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Antikörper-Nachweise von Cyp2b10 erfolgte relativ im Vergleich zur internen Kontrolle Gapdh. (A+B) Exemplarische Blots exponierter F₀-Tiere (A) drei Monate nach Injektion von TCPOBOP (3 mg/kg) oder dem Lösungsmittel DMSO/Maiskeimöl (10/90) und 6 Tage alter Nachkommen (B) präkonzeptionell exponierter Weibchen. (C) Gegenüberstellung der Quantifizierungsergebnisse aus Westernblot und qPCR für die in A+B gezeigten Versuchsgruppen.

w: weiblich, m: männlich

(vergleichende Darstellung aller Versuchsgruppen vgl. A3 Tab. A 2)

3.2 Phänotypische Konsequenzen

3.2.1 Fremdstoffmetabolismus

Die massiven Veränderungen der Cyp2b10 Expression legen eine nachhaltige Beeinflussung des hepatischen Fremdstoffmetabolismus exponierter Tiere und ihrer Nachkommen nahe. Um dies auf funktioneller Ebene zu analysieren, wurde die individuelle metabolische Kapazität anhand von medikamentös induzierter Paralyse durch Applikation des Muskelrelaxanziums und Cyp-Substrats Zoxazolamin (Chen *et al.* 2012, Willson und Kliewer 2002, Zhang *et al.* 2004) untersucht, wobei die Dauer der Paralyse als Maß für die Cyp-Aktivität diente.

Sowohl adulte präkonzeptionell mit TCPOBOP vorbehandelte Weibchen als auch ihre direkten Nachkommen zeigen eine signifikante Reduktion der Paralysezeit (vgl. Abb. 8). Während die Maiskeimölkontrollen beider Generationen etwa 180 min brauchen, um sich selbstständig

aus der Rückenlage aufzurichten, benötigen die Tiere der TCPOBOP-Gruppen im Schnitt mit etwa 90 min nur halb so lange.

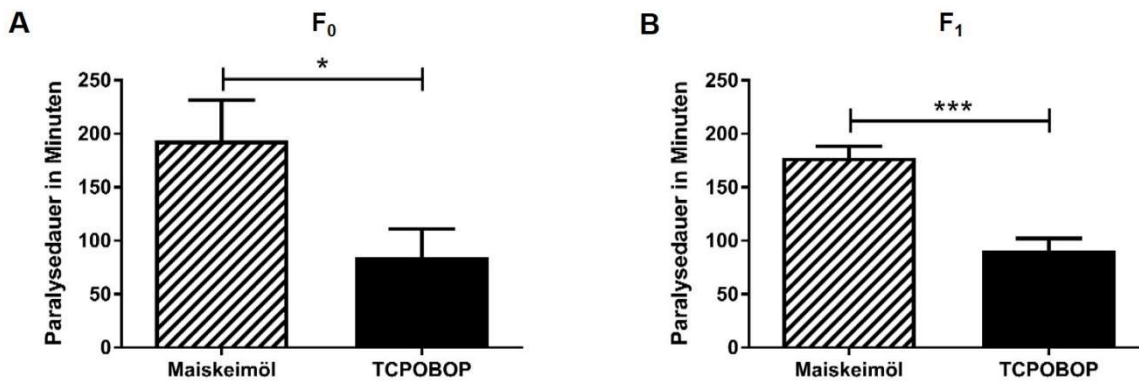


Abb. 8: Durch TCPOBOP Exposition ausgelöste Veränderungen in der Kapazität des Fremdstoffmetabolismus detektiert anhand der Zoxazolamin-Paralysedauer

Vergleich der Zoxazolamin-induzierten (175 mg/kg i.p.) Paralysedauer von TCPOBOP-vorbehandelten (3 mg/kg i.p.) F₀ Weibchen und zugehörigen Maiskeimöl-Kontrollen 13 Wochen nach Exposition (A; n=6) sowie ihren 9 Wochen alten Nachkommen (B; n=16-19). Dargestellt ist die Paralysedauer in Minuten, welche der Zeit entspricht, die die Mäuse benötigten, um sich selbstständig aus einer Rückenlage aufzurichten (Mittelwert mit Standardfehler). Statistisch signifikante Unterschiede wurden abhängig vom Ergebnis eines Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung mittels t-Test (A) bzw. Mann-Whitney-Test (B) ermittelt und mit Sternchen gekennzeichnet (*, p<0,05; ***, p<0,001)

3.2.2 Knochenhomöostase

Männliche CAR-Knockout Mäuse zeigen eine erhöhte Knochenmineraldichte (BMD), welche - wie Cho et al. (2014) postulieren - auf die erniedrigte hepatische Basalexpression der testosteron-metabolisierenden CAR-Zielgene Cyp2b9 und Cyp2b10 und die entsprechend erhöhte Serumkonzentration des osteoanabolen Sexualhormons zurückzuführen sein könnte. Ausgehend von diesen Beobachtungen sollte eine anhaltende Induktion von Cyp2b10 einen Anstieg im Testosteronmetabolismus und eine Reduktion der BMD hervorrufen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden ex vivo Micro-CT-Messungen von Tibien und Lendenwirbeln (T. D.; MOIN CC) sowie ELISA-Analysen knochenspezifischer Serummarker (U. G.-A.; Institut für Pharmakologie Universitätsmedizin Mainz) durchgeführt.

Die radiologischen Untersuchungen umfassten die Spongiosa der Lendenwirbel sowie kortikalen Knochen von Wirbeln und Tibien männlicher F₀ Tiere zwölf Wochen nach der (ersten) Exposition gegenüber TCPOBOP 3 mg/kg (einmalig), TCPOBOP 0,5 mg/kg (wöchentlich) oder dem Lösungsmittel Maiskeimöl (einmalig) sowie zwölf Wochen alter männlicher Nachkommen präkonzeptionell exponierter weiblicher Mäuse.

Einmalig mit TCPOBOP (3 mg/kg) injizierte F₀ Tiere weisen in der Spongiosa signifikante Anstiege der trabekulären Dicke von (Tb.Th; ~25 µm auf ~28 µm ± 11,3 %; vgl. Abb. 9H) und

des Knochen-Volumen-Anteils (BV/TV; 11,5 %; vgl. Abb. 9E) auf. Die Veränderung des BV/TV-Verhältnisses geht dabei auf eine 18,7%ige Zunahme des Knochenvolumens (BV; Abb. 9F) und einen 5,5%igen Anstieg des Gesamtvolumens (TV; Abb. 9G) zurück.

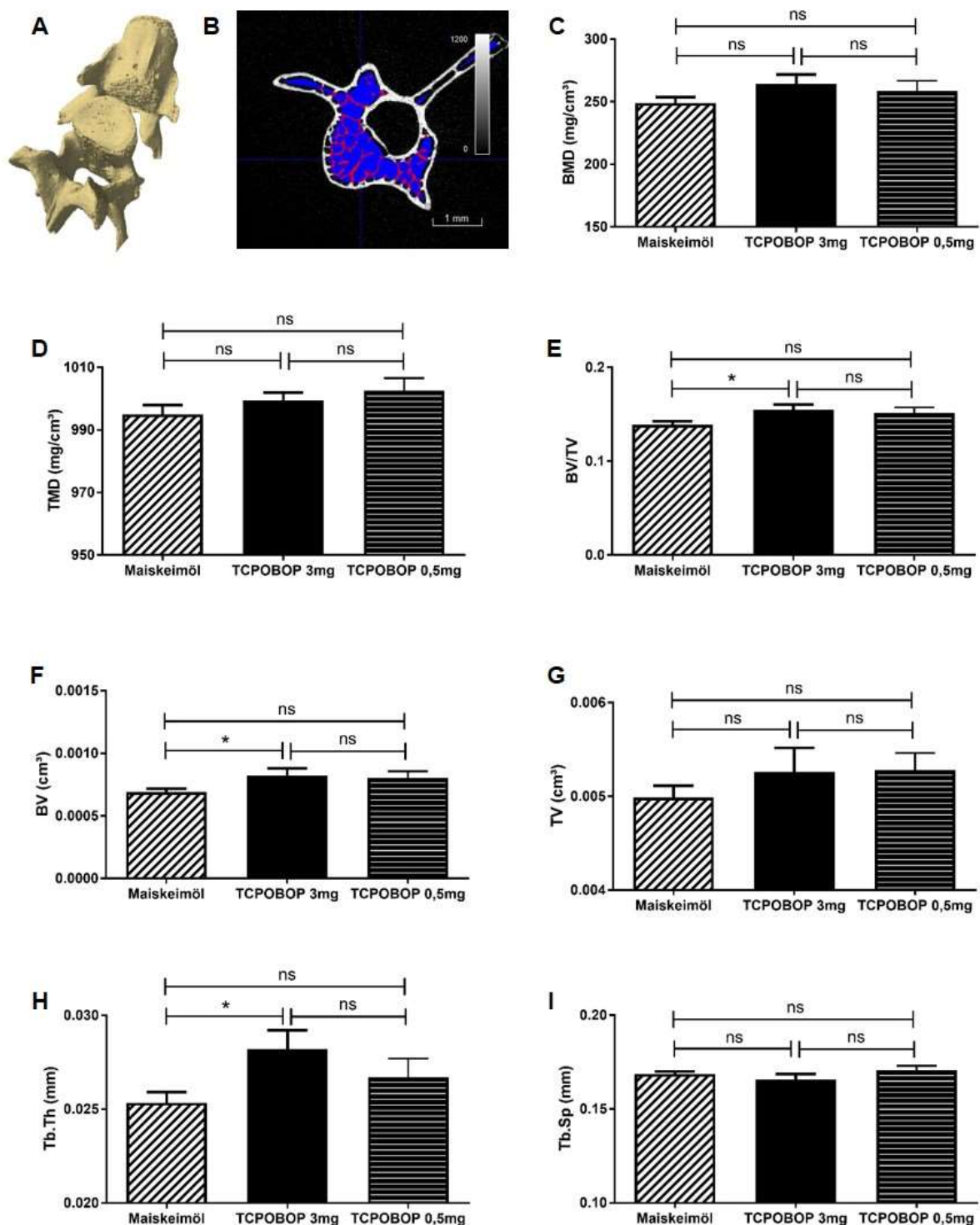


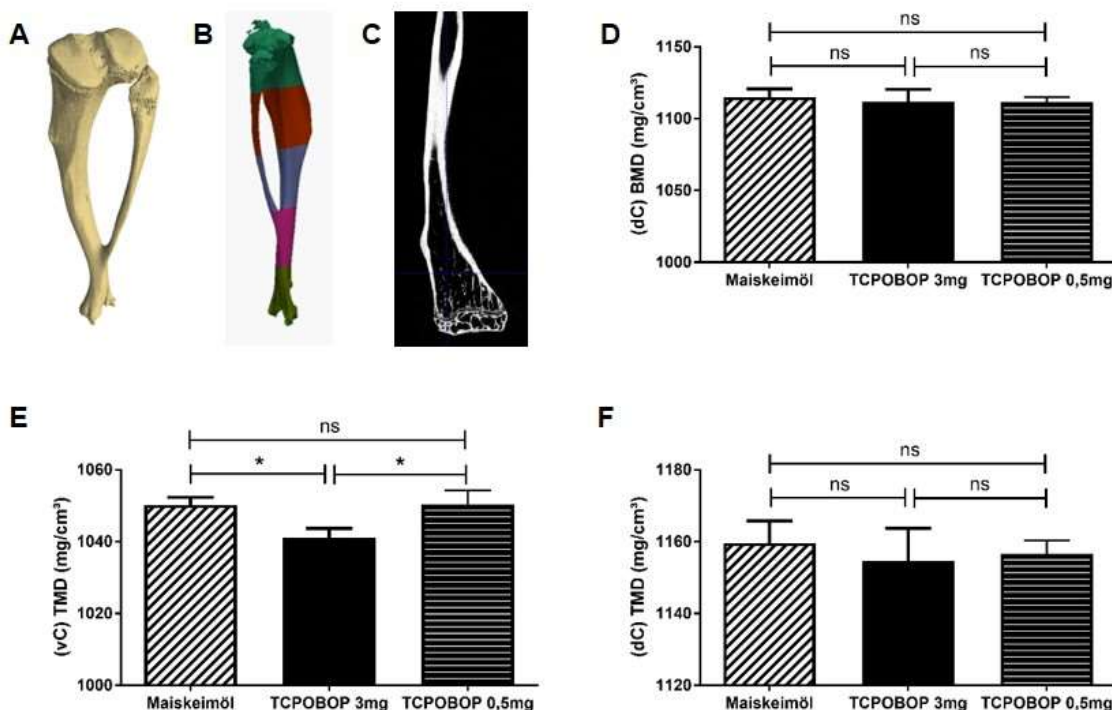
Abb. 9: Radiologische Untersuchungen der vertebralen Spongiosa TCPOBOP behandelter Tiere

Vergleich von Mineralisierungsstatus und Knochenstrukturparametern des trabekulären Lendenwirbelbereichs männlicher Mäuse zwölf Wochen nach der (ersten) Exposition gegenüber dem Lösungsmittel Maiskeimöl (einmalig), 3 mg/kg TCPOBOP (einmalig) oder 0,5 mg/kg TCPOBOP (wöchentlich). (A) Dreidimensionale Darstellung muriner Lendenwirbel basierend auf den Mikro-CT-Scans; (B) Querschnittaufnahme zur

Veranschaulichung der Segmentierung in kortikalen (weiß) und trabekulären (rot) Knochen; (C-I) Anhand der Mikro-CT-Messungen wurden neben Knochenmineraldichte (C) und gewebspezifischer Mineraldichte (D) auch der Knochen-Volumenanteil (E) berechnet aus Knochenvolumen (F) und Gesamtvolumen (G), sowie die trabekuläre Dicke (H) und der mittlere Freiraum zwischen den Trabekeln (I) bestimmt. Alle Parameter sind ausgehend vom Durchschnitt zweier pro Tier gemessener Wirbel als Gruppen-Mittelwerte ($n=10$) mit Standardfehler dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels einfaktorier Varianzanalyse und Tukey-Kramer Post-hoc Test unter Verwendung der Software SAS JMP (V. 9.0.0; SAS Corporation, Cary USA) ermittelt und mit Sternchen gekennzeichnet (*, $p<0,05$). Abbildung erstellt basierend auf Daten aus Micro-CT-Analysen durchgeführt von T. D. (MOIN CC).

Weder die Knochenmineraldichte (BMD; $\emptyset = 260 \text{ mgHA/cm}^3$; Abb. 9C) noch die spezifische Dichte des mineralisierten Gewebes (TMD; $\emptyset = 1000 \text{ mgHA/cm}^3$; Abb. 9D) zeigen signifikante Unterschiede; allerdings sind Trends zur Zunahme zu erkennen. Der mittlere Freiraum zwischen den Trabekeln (Tb.Sp; Abb. 9I) hingegen bleibt unverändert. In der Spongiosa von Männchen, die wöchentlich mit TCPOBOP (0,5 mg/kg) behandelt wurden, sind zwar keine signifikanten Veränderungen zur Lösungsmittelkontrolle zu erkennen, tendenziell ähneln die Ergebnisse aber den nach der höheren einmaligen Dosis beobachteten Effekten.

Bei der Analyse des kortikalen Knochens wurde neben dem Kortextbereich der Lendenwirbel (vC; vgl. Abb. 9B) auch der diaphysäre Kortext (dC) der Schienbeine berücksichtigt. In der F_0 Generation ergibt sich für beide Messbereiche keine Veränderung der Knochenmineraldichte (vgl. Abb. 10D) zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Auch der Knochen-Volumen-Anteil (BV/TV) erscheint unverändert, da Knochenvolumen (BV; Abb. 10G) und Gesamtvolumen (TV; Abb. 10H) gleichmäßig um etwa 5% steigen.



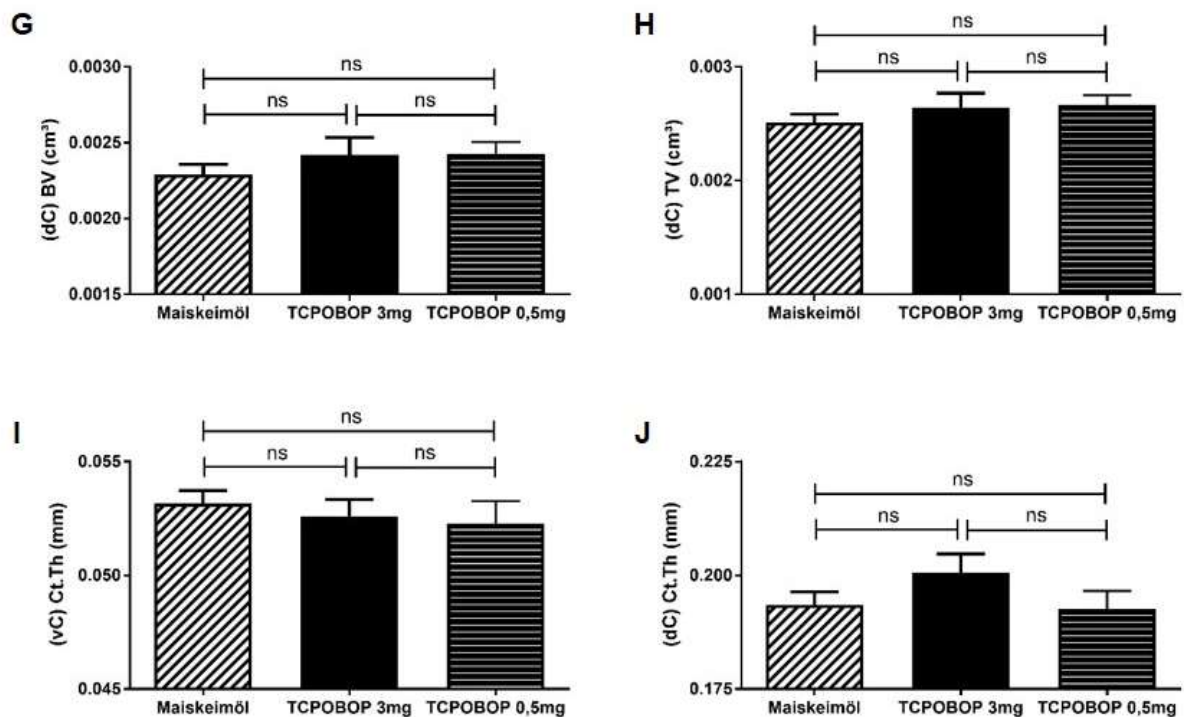


Abb. 10: Radiologische Untersuchungen des kortikalen Knochens TCPOBOP behandelter Tiere

Vergleich von Mineralisierungsstatus und Knochenstrukturparametern des kortikalen Knochens männlicher Mäuse zwölf Wochen nach der (ersten) Exposition gegenüber dem Lösungsmittel Maiskeimöl (einmalig), 3 mg/kg TCPOBOP (einmalig) oder 0,5 mg/kg TCPOBOP (wöchentlich); berücksichtigt wurden dabei der diaphysäre Kortex der Tibien (dC) sowie der kortikale Lendenwirbelbereich (vC; vgl. Abb. 9B); (A) dreidimensionale Darstellung einer murinen Tibie basierend auf den Mikro-CT-Scans; (B) Verdeutlichung der vor der Auswertung durchgeführten Segmentierung zur Erfassung des diaphysären Kortex (mittlerer blauer Bereich) (C) Röntgenlängsschnitt einer murinen Tibie; (D-J) anhand der Mikro-CT-Messungen wurden neben Knochenmineraldichte (D) und gewebsspezifischer Mineraldichte (E+F) auch Knochenvolumen (G) und Gesamtvolumen (H) sowie die kortikale Dicke (I+J) bestimmt. Alle Parameter sind ausgehend vom Durchschnitt zweier pro Tier gemessener Wirbel bzw. ausgehend von einer pro Tier gemessenen Tibie als Gruppen-Mittelwerte (n=10) mit Standardfehler dargestellt, wobei deckungsgleiche Resultate beider Messbereiche exemplarisch für nur einen Bereich abgebildet sind. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse und Tukey-Kramer Post-hoc Test unter Verwendung der Software SAS JMP (V. 9.0.0; SAS Corporation, Cary USA) ermittelt und mit Sternchen gekennzeichnet (*, p<0,05). Abbildung erstellt basierend auf Daten aus Micro-CT-Analysen durchgeführt von T. D. (MOIN CC).

Während die gewebsspezifische Mineraldichte in den Schienbeinen nur minimal vermindert ist (vgl. Abb. 10F), zeigen einmalig mit TCPOBOP (3 mg/kg) injizierte F₀ Tiere eine signifikante Reduktion der TMD (1050,2 mgHA/cm³ → 1041,1 mgHA/cm³; vgl. Abb. 10E) im Wirbelkortex. Umgekehrt ist die kortikale Dicke (Ct.Th) in den Lendenwirbeln dieser Mäuse unverändert (vgl. Abb. 10I), im diaphysären Kortex jedoch deutlich - wenn auch nicht signifikant - erhöht (193 µm → 201 µm; p=0,38; vgl. Abb. 10J).

Zur Untersuchung möglicher generationsübergreifender Effekte wurden zwölf Wochen alte männlichen Nachkommen weiblicher präkonzeptionell einmalig mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl behandelte Mäuse genutzt. Die Mikro-CT-Messungen von Tibien und Wirbeln dieser F₁-Tiere zeigen konsistent in allen drei Messbereichen eine minimale Reduktion der gewebsspezifischen Mineraldichte (vgl. Abb. 11B). Die Knochenmineraldichte der TCPOBOP-

Nachkommen entspricht in den Schienbeinen der Kontrollgruppe, weicht in den Wirbel jedoch um bis zu 10 mgHA/cm^3 nach oben ab (BMD; vgl. Abb. 11A).

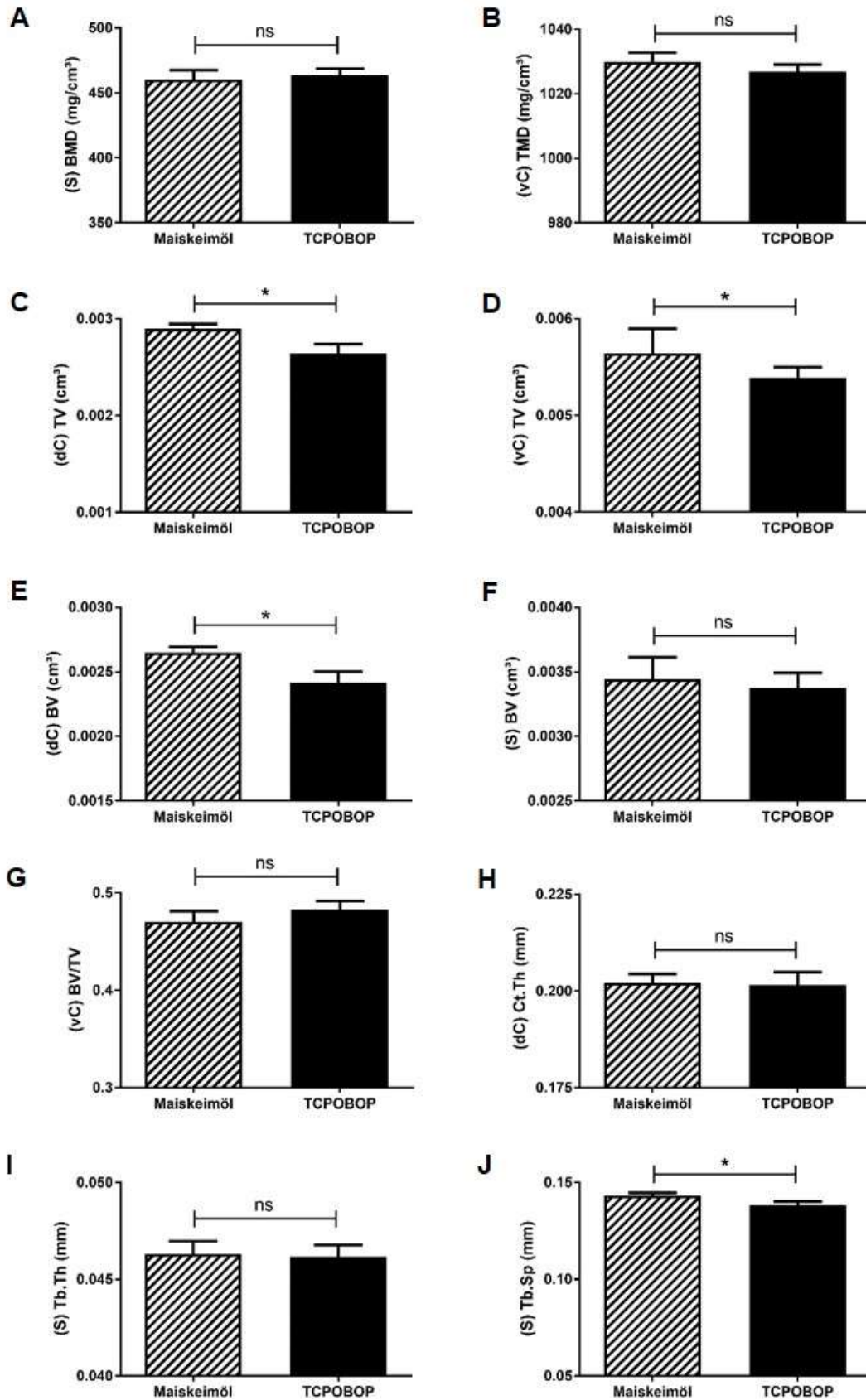


Abb. 11: Radiologische Untersuchungen von trabekulärem und kortikalem Knochen der Nachkommen TCPOBOP behandelte Tiere

Vergleich von Mineralisierungsstatus und Knochenstrukturparametern des Knochens männlicher zwölf Wochen alter Nachkommen präkonzeptionell einmalig mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl behandelte adulter weiblicher Mäuse; berücksichtigt wurden der diaphysäre Kortex der Tibien (dC) sowie der kortikale (vC) und trabekuläre (S) Lendenwirbelbereich; (A-J) anhand der Mikro-CT-Messungen wurden neben Knochenmineraldichte (A) und gewebspezifischer Mineraldichte (B) auch Gesamtvolumen (C+D) und Knochenvolumen (E+F) sowie die Strukturparameter kortikale Dicke (H), trabekuläre Dicke (I) und der mittlere Freiraum zwischen den Trabekeln (J) bestimmt. Alle Parameter sind ausgehend vom Durchschnitt zweier pro Tier gemessener Wirbel bzw. Tibien als Gruppen-Mittelwerte (n=10) mit Standardfehler dargestellt, wobei deckungsgleiche Resultate mehrerer Messbereiche exemplarisch nur einmal abgebildet sind. Statistisch signifikante Unterschiede wurden abhängig vom Ergebnis eines Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung mittels t-Test (A, B, C, E, F, H, I, J) bzw. Mann-Whitney-Test (D, G) ermittelt und mit Sternchen gekennzeichnet (*, p<0,05). Abbildung erstellt basierend auf Daten aus Micro-CT-Analysen durchgeführt von T. D. (MOIN CC).

Während der Knochen-Volumen-Anteil (BV/TV) in den Tibien durch eine gleichmäßige 8,8%ige Abnahme des Knochenvolumens (BV; Abb. 11E) und des Gesamtvolumens (TV; Abb. 11C) unverändert erscheint, führt in beiden vertebraalen Messbereichen die ungleichmäßige Reduktion von TV (ca. 4,5%; vgl. Abb. 11D) und BV (ca. 1,7 %; vgl. Abb. 11F) zu einem minimalen Anstieg des Verhältnisses (vgl. Abb. 11G). Hinsichtlich der mikrostrukturellen Parameter ist weder im diaphysären Kortex (dC) der Schienbeine noch im vertebraalen Kortex (vC) eine Änderung der kortikalen Dicke (Ct.Th; vgl. Abb. 11H) zu erkennen. In der Spongiosa hingegen fällt eine deutliche Reduktion des mittleren trabekulären Abstands auf (143µm → 138µm; Tb.Sp; vgl. Abb. 11J), trotzdem die trabekuläre Dicke (Tb.Th; vgl. Abb. 11I) nicht beeinflusst scheint.

Zur besseren Übersicht sind die soeben im Einzelnen beschriebenen Ergebnisse der radiologischen Untersuchungen beider Generationen nachfolgend noch einmal tabellarisch zusammengefasst.

Tab. 8: Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse der radiologischen Untersuchungen

→ gestiegen;
 ← gesunken
 (n.s.) nicht signifikant (Trend)

F ₀	Vertebrae		Tibiae
	Trabekulärer Bereich	Kortikale Region	Diaphysärer Kortex
TV	→ (n.s.)	→ (n.s.)	→ (n.s.)
BV	→	→ (n.s.)	→ (n.s.)
BV/TV	→	unverändert	unverändert
Tb.Th / Ct.Th	→	unverändert	→ (n.s.)
Tb.Sp.	unverändert	<i>In kortikalem Knochen nicht vorhanden</i>	
TMD	→ (n.s.)	←	← (n.s.)
BMD	→ (n.s.)	unverändert	unverändert

F ₁	Vertebrae		Tibiae
	Trabekulärer Bereich	Kortikale Region	Diaphysärer Kortex
TV	←	←	←
BV	← (n.s.)	← (n.s.)	←
BV/TV	→ (n.s.)	→ (n.s.)	unverändert
Tb.Th / Ct.Th	unverändert	unverändert	unverändert
Tb.Sp.	←	<i>In kortikalem Knochen nicht vorhanden</i>	
TMD	← (n.s.)	← (n.s.)	← (n.s.)
BMD	→ (n.s.)	→ (n.s.)	unverändert

Ergänzend zu den radiologischen Untersuchungen von Mineralisierungsstatus und Knochenstrukturparametern wurden auch antikörperbasierte Nachweise knochenspezifischer Marker im Blutserum derselben Mäuse durchgeführt. Neben der Konzentration des osteoanabolen Sexualhormons Testosteron (Cho *et al.* 2014, Vanderschueren *et al.* 2004) wurden P1NP und Osteocalcin als Maß für knochenbildende Osteoblasten-Aktivität sowie CTX-1, welches mit Osteoclasten-vermittelten katabolen Prozessen korreliert, bestimmt (Cho *et al.* 2014, Demant 2009, Seibel 2005, Wheeler *et al.* 2013).

Die Testosteron-Serumkonzentration von einmalig mit TCPOBOP vorbehandelten Mäusen ist im Mittel deutlich - allerdings nicht signifikant - erhöht (3,45 ng/ml → 5,01 ng/ml, p=0,16; vgl. Abb. 12A). Die wöchentlich exponierten Tiere zeigen einen vergleichbaren Trend. In den männlichen Nachkommen injizierter Weibchen hingegen erscheint die Konzentration tendenziell eher abgesenkt (vgl. Abb. 12B). Ein ähnliches Bild liefert die Analyse von CTX-1, dem C-terminalen Telopeptid von Kollagen I, welches beim Abbau der organischen Knochenmatrix (Osteoid) frei wird. Die höhere Dosis TCPOBOP bewirkt in der F₀ Generation einen signifikanten Anstieg von CTX-1 (23,08 ng/ml → 35,09 ng/ml, vgl. Abb. 12C); die niedrigere einen etwas abgeschwächten, nicht signifikanten Effekt (23,08 ng/ml → 30,36 ng/ml; p=0,28). Im Gegensatz dazu ist in F₁ Mäusen eine leicht reduzierte Serumkonzentration nachweisbar (vgl. Abb. 12D). Der Gehalt an dem während der Synthese abgespaltenen N-terminalen Propeptid von Kollagen I (P1NP) erscheint nach einmaliger Applikation von TCPOBOP (3 mg/kg) unverändert, wohingegen die mehrfache Exposition mit 0,5 mg/kg eine Reduktion (63,93 ng/ml → 46,53 ng/ml; vgl. Abb. 12E) hervorruft. Auch für P1NP zeigen die F₁ Tiere einen zur Elterngeneration gegenläufigen Trend (vgl. Abb. 12F). Lediglich der hormonell aktive Osteoid-Bestandteil Osteocalcin ist in beiden Generationen nach TCPOBOP konsistent beeinflusst. Während bereits in einmalig behandelten F₀ Mäusen ein deutlicher Anstieg der Konzentration zu erkennen ist (31,6 ng/ml → 45,69 ng/ml; p=0,15; vgl. Abb. 12G), findet sich im Serum der F₁ Tiere eine signifikant erhöhte Menge Osteocalcin (73,23 ng/ml → 104,84 ng/ml; vgl. Abb. 12H).

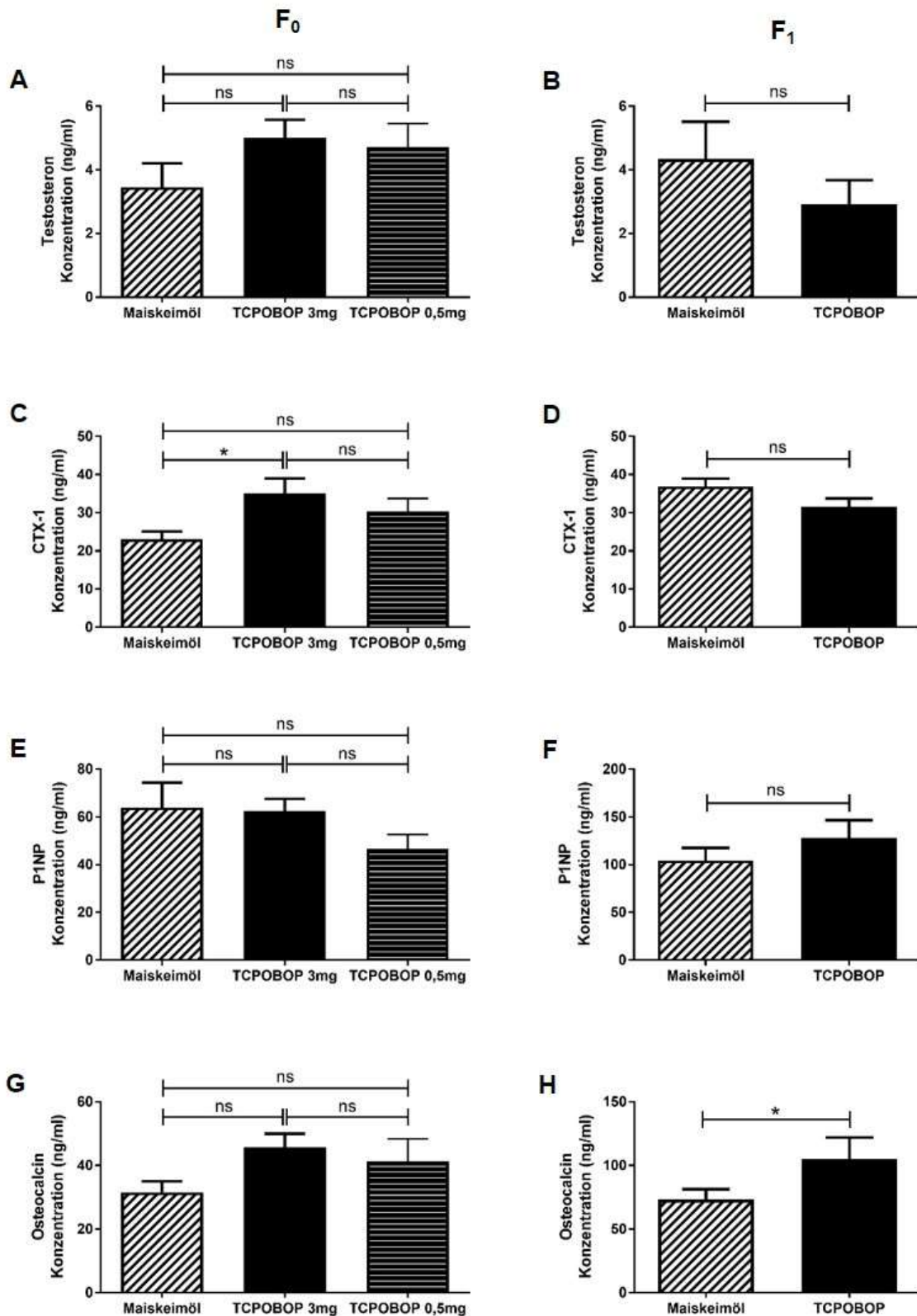


Abb. 12: ELISA-basierte Konzentrationsbestimmung knochenspezifischer Marker im Blutserum TCPOBOP behandelter Tiere und ihrer Nachkommen

Knochenspezifische Marker im Blutserum männlicher Mäuse (F₀: links) zwölf Wochen nach der (ersten) Exposition gegenüber dem Lösungsmittel Maiskeimöl (einmalig), 3 mg/kg TCPOBOP (einmalig) oder 0,5 mg/kg TCPOBOP (wöchentlich) und zwölf Wochen alter Nachkommen (F₁: rechts) präkonzeptionell einmalig mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl behandelter adulter weiblicher Mäuse. Mit Hilfe kommerzieller ELISA-Lösungen (vgl. 2.2.7; Tab. 4) wurden das osteoanabole Sexualhormon Testosteron (A+B), das Knochen-Abbauprodukt CTX-1 (C-terminales Telopeptid von Kollagen I; C+D) sowie die Marker für knochenbildende Osteoblasten-Aktivität P1NP (N-terminales

Propeptid von Kollagen I; E+F) und Osteocalcin (G+H) untersucht. Dargestellt sind die jeweiligen Serumkonzentrationen in ng/ml (Mittelwert mit Standardfehler; n=6-10). Unterschiede wurden abhängig vom experimentellen Design und dem Ergebnis eines Shapiro-Wilk Tests auf Normalverteilung mittels einfaktorierter Varianzanalyse und Tukey-Kramer Post-hoc Test (C, E, G) bzw. Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-hoc Test (A) oder t-Test (D, F) bzw. Mann-Whitney-Test (B, H) ermittelt und mit Sternchen gekennzeichnet (*, $p < 0,05$). Abbildung erstellt basierend auf Daten aus ELISA-Analysen durchgeführt von U. G.-A. (Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin Mainz).

3.2.3 Energiemetabolismus

Für Mäuse sind zahlreiche Interferenzen der CAR-vermittelten Detoxifizierung und des Energiestoffwechsels wie reduzierte Blutglukose, verbesserte Glukosetoleranz, die Reduktion von Fettmasse und Körpergewicht, die Abnahme von Total-, LDL- und HDL-Cholesterin sowie eine Protektion gegenüber den Folgen einer hochkalorischen Diät beschrieben (Chai *et al.* 2016, Dong *et al.* 2009b, Gao *et al.* 2009, Kobayashi *et al.* 2015, Masson *et al.* 2008, Rezen *et al.* 2009) (vgl. 1.4). Entsprechend wurde im Rahmen dieser Arbeit der hepatische Energiemetabolismus sowohl auf transkriptioneller Ebene anhand von Expressionsanalysen verschiedener Markergene als auch auf funktioneller Ebene durch Glukosetoleranztests, Gewichts- und Blutanalysen hinsichtlich möglicher generationsübergreifender Störungen in Glukose- oder Lipidhomöostase nach TCPOBOP-Exposition untersucht. Dabei wurden nicht nur Tiere unter Normaldiät verwendet, sondern auch Mäuse, die nach Exposition für neun Wochen mit einer hochkalorischen Diät (HFD) oder der entsprechenden normalkalorischen Kontrolle (nachfolgend als Standarddiät bezeichnet, SD) ernährt worden waren (vgl. 2.3.5).

Die fortlaufende Beobachtung der Gewichtsentwicklung der mit Maiskeimöl vorbehandelten Tiere verdeutlicht die massive Gewichtszunahme der Tiere durch hochkalorische Ernährung (HFD) im Vergleich zur Standarddiät-Kontrolle (SD) (vgl. Abb. 13A). Am deutlichsten wird der Effekt in der letzten Woche, obwohl die Tiere durch 16-stündiges Fasten am Ende des Versuchs sichtbar Gewicht verlieren. Die Maiskeimöl HFD F_0 Männchen sind in der letzten Messung mit durchschnittlich 37,85 g gut 34% schwerer als die entsprechenden SD Kontrollen mit 28,15 g. In der F_1 Generation kann man darüber hinaus in beiden Diät-Gruppen sehr gut den erwarteten statistisch signifikanten Gewichtsunterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren (***, $p < 0,001$) erkennen (vgl. Abb. 13B). In der F_0 Generation bleiben bereits die mit Standarddiät gefütterten Tiere nach TCPOBOP Exposition signifikant leichter als die Maiskeimölkontrollen (\emptyset -3,4 g; ***, $p = 0009734$). Der Effekt maximiert sich in der HFD Gruppe, in welcher die mit TCPOBOP behandelten Mäuse im Versuchsverlauf durchschnittlich 7,85 g weniger wiegen als die HFD Lösungsmittelkontrollen (***, $p = 1,183e^{-15}$) und sogar leichter sind als die Kontrolltiere der SD-Gruppe. In der F_1 Generation ist dieser in der Literatur vielfach beschriebene Schutz vor den Folgen hochkalorischer Ernährung (Chai *et al.* 2016, Dong *et al.* 2009b, Gao *et al.* 2009, Masuyama und Hiramatsu 2012, Yang und Wang 2014) jedoch nicht mehr nachweisbar. Zwar zeigen die SD Gruppen beider Geschlechter erneut eine

signifikante Gewichtsreduktion nach TCPOBOP Exposition (\bar{x} -1,6 g; ***, $p = 0003776$), doch unter hochkalorischer Ernährung ist insbesondere bei Männchen eher ein minimaler Anstieg des Körpergewichts (\bar{x} +0,76 g; $p = 0,32$) in den Nachkommen von TCPOBOP behandelten Weibchen zu erkennen. Vergleichbare Effekte konnten auch bei der Analyse der abdominalen Fettmenge ermittelt werden (vgl. A3 Abb. A 5).

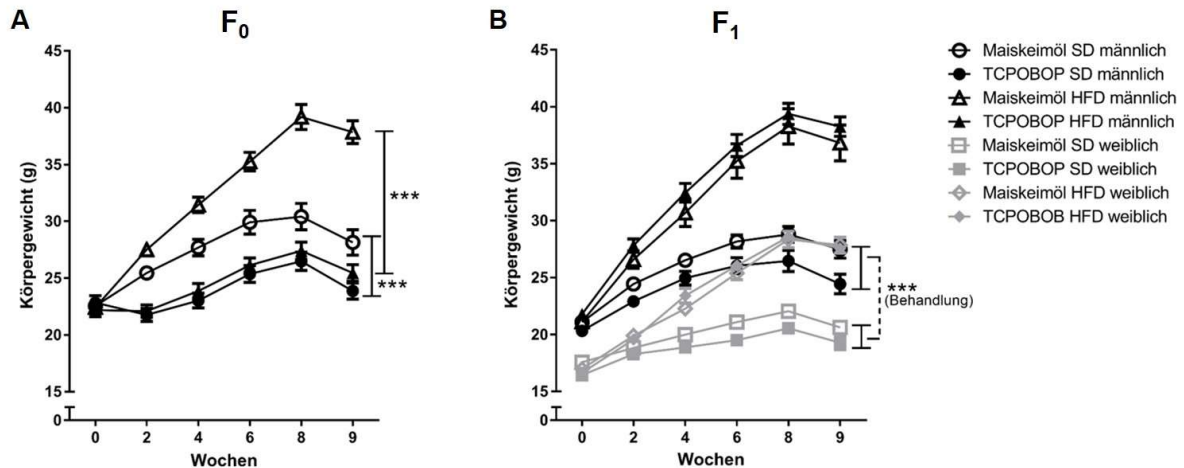


Abb. 13: Gewichtsentwicklung von TCPOBOP vorbehandelten Mäusen und ihren Nachkommen unter hochkalorischer Diät

Gewichtsentwicklung zu Versuchsbeginn sechs Wochen alter Mäuse im Verlauf einer neunwöchigen hochkalorischer Diät (HFD) im Vergleich zur Standarddiät (SD). (A) Männliche F_0 Mäuse, die unmittelbar vor der Futterumstellung mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl injiziert wurden; (B) Nachkommen (F_1) weiblicher Mäuse, die im Alter von 9 Wochen mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl injiziert und eine Woche danach mit unbehandelten Böcken verpaart wurden; dargestellt sind die im Versuchsverlauf zunächst 14-tägig und am Versuche nach 16-stündigem Fasten ermittelten Körpergewichte (g) (Mittelwert mit Standardfehler; F_0 n=7-8; F_1 männlich n=9; F_1 weiblich n=6-11). Die einzelnen nach Diät und Geschlecht getrennten Versuchsgruppen sind durch identische Symbole gekennzeichnet, wobei diese für TCPOBOP ausgefüllt und für Maiskeimölkontrollen ungefüllt sind. Durch die TCPOBOP-Exposition bedingte Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen wurden von F. M. (Institut für Medizinische Biostatistik, Epidemiologie und Informatik, Universitätsmedizin Mainz) unter Verwendung der Software R (V. 3.3.0) und eines über REML („restricted maximum likelihood“) angepassten linearen gemischten Modells mittels Wald-Test ermittelt und mit Sternchen gekennzeichnet (***, $p < 0,001$).

Um festzustellen, ob der durch TCPOBOP vermittelte Schutz vor Gewichtszunahme auf einen erhöhten Stoffwechselumsatz oder auf verminderte Nahrungsaufnahme zurückzuführen ist, wurde neben der Gewichtsentwicklung auch der Futterverbrauch der Tiere im Verlauf des Experiments erfasst. Abbildung 14 zeigt exemplarisch die Nahrungsaufnahme der F_0 Männchen, wobei auffällt, dass die mit TCPOBOP behandelten Tiere beider Diätgruppen in der ersten Woche durchschnittlich sehr viel weniger Futter aufgenommen haben als die entsprechenden Maiskeimölkontrollen (vgl. Abb. 14A: $SD_{TCPOBOP}$ 12,3 g / $SD_{Maiskeimöl}$ 18,9 g; Abb. 14B: $HFD_{TCPOBOP}$ 14,2 g / $HFD_{Maiskeimöl}$ 15,3 g). Eine hier nicht dargestellte parallel geplante weibliche F_0 Generation verweigerte die Nahrungsaufnahme nahezu vollständig, so dass der Versuch für diese Tiere abgebrochen werden musste. Ab der zweiten Woche ist der Futterverbrauch beider Behandlungsgruppen unter Standarddiät weitestgehend gleich (vgl. Abb. 14A), wohingegen die hochkalorisch ernährten TCPOBOP Tiere anhaltend weniger zu fressen scheinen als die Lösungsmittelkontrollen ($HFD_{TCPOBOP}$ 14 g / $HFD_{Maiskeimöl}$ 16,7 g;

$p=0,1467$; vgl. Abb. 14B). Betrachtet man jedoch anstelle des absoluten den relativen Futtermittelverbrauch dieser Tiere im Verhältnis zum Körpergewicht (Gao *et al.* 2009) zeigt sich, dass beide Gruppen mit etwa $0,6 \text{ g}_{\text{Futtermittel}}/\text{g}_{\text{Körpergewicht}}$ gleich viel zu sich nehmen.

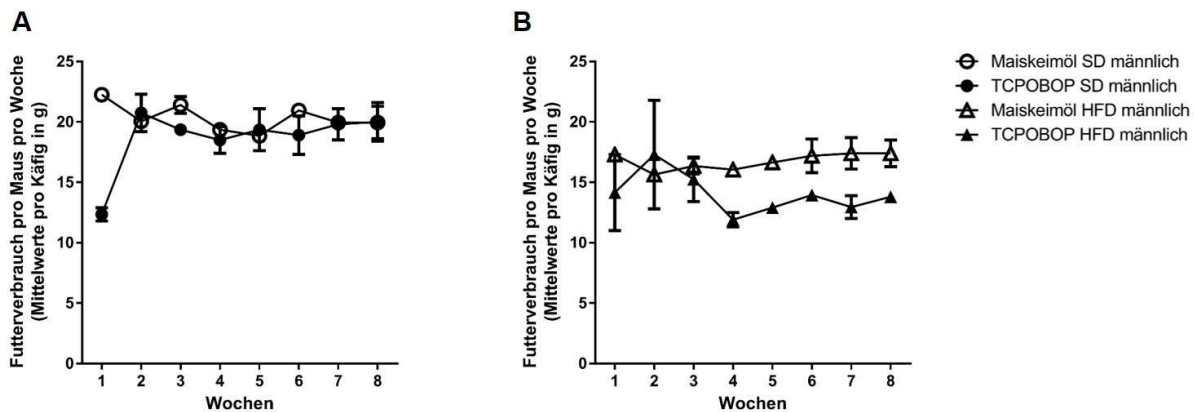


Abb. 14: Absoluter Futtermittelverbrauch TCPOBOP vorbehandelter Mäuse unter hoch-kalorischer Diät
 Absoluter Futtermittelverbrauch männlicher F_0 Mäuse, die im Alter von sechs Wochen mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl injiziert und nachfolgend für neun Wochen *ad libitum* mit (A) einer normal-kalorischen Standarddiät (SD) oder (B) einer hochkalorischen Diät (HFD) gefüttert wurden. Dargestellt ist der wöchentlich ermittelte Futtermittelverbrauch pro Maus (g), welcher anhand des Käfigverbrauchs bestimmt wurde (Mittelwert mit Standardfehler; $n=2$). Die einzelnen nach Diät getrennten Versuchsgruppen sind durch identische Symbole gekennzeichnet, wobei diese für TCPOBOP ausgefüllt und für Maiskeimölkontrollen ungefüllt sind. Auf Grund der kleinen Anzahl an Käfigen wurde keine statistische Analyse durchgeführt.

Die TCPOBOP vermittelten protektiven Effekte scheinen demnach auf einen veränderten Stoffwechsel zurückzugehen, was zu den in der Literatur beschriebenen Beeinflussungen von Glukose- und Fettstoffwechsel passt (vgl. 1.4) (Dong *et al.* 2009b, Gao *et al.* 2009, Kobayashi *et al.* 2015, Masson *et al.* 2008, Rezen *et al.* 2009).

Sowohl in Mäusen als auch im Menschen konnten bereits reduzierte Blutglukose sowie verbesserte Insulinsensitivität und Glukosetoleranz unmittelbar nach Aktivierung von CAR gezeigt werden (Dong *et al.* 2009b, Gao *et al.* 2009, Lahtela *et al.* 1985, Mo und He 2014, Venkatesan *et al.* 1994, Yasujima *et al.* 2016). Zur Untersuchung möglicher - durch TCPOBOP ausgelöster - generationsübergreifender Veränderungen der Glukosehomöostase wurden deshalb am Ende des Experiments zur hochkalorischen Diät auch Glukosetoleranztests (GTTs; vgl. 2.3.5) in F_0 und F_1 Tieren durchgeführt. Bereits die zu Beginn der GTTs nach 16-stündigem Fasten gemessenen basalen Blutglukosewerte verdeutlicht die erhebliche Beeinflussung des Energiemetabolismus durch hochkalorische Ernährung (HFD) im Vergleich zur Standarddiät-Kontrolle (SD). So liegt der Blutzucker aller HFD Gruppen im Schnitt etwa 67% über dem Wert der SD Gruppen. Hinsichtlich der TCPOBOP Exposition zeigen die vorbehandelten F_0 Böcke beider Diätgruppen keine signifikante Veränderung zu den Maiskeimölkontrollen, jedoch einen Trend zur Reduktion der Blutglukose (SD: $p=0,33$; HFD: $p=0,167$; vgl. Abb. 15B). Auch in der F_1 Generation sind keine signifikanten Unterschiede zu

erkennen, wobei die Konzentration in Weibchen scheinbar ebenfalls geringfügig sinkt (vgl. Abb. 15D), in Männchen hingegen schwach steigt (vgl. Abb. 15C).

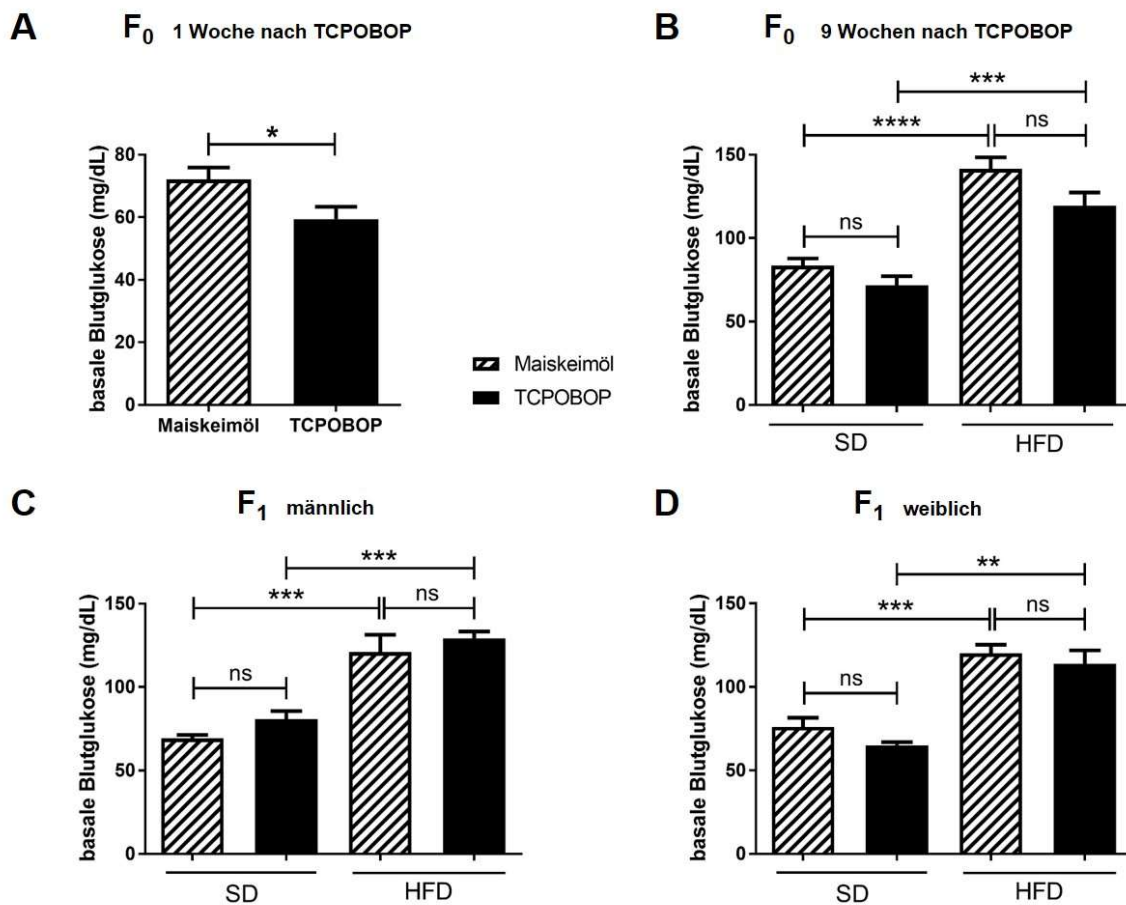


Abb. 15: Basale Blutglukosemessungen TCPOBOP vorbehandelter Mäuse und ihrer Nachkommen

Blutglukose Messungen adulter, über Nacht gefasteter, C57BL/6 Mäuse mit dem CONTOUR® XT Blutzuckermessgerät (A) Neun Wochen alte Böcke eine Woche nach der Injektion von TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl [keine besondere Diät] (B) Männliche F₀ Mäuse, die im Alter von sechs Wochen mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl injiziert und nachfolgend für neun Wochen *ad libitum* mit einer normal-kalorischen Standarddiät (SD) oder einer hochkalorischen Diät (HFD) gefüttert wurden (C+D) Männliche (C) und weibliche (D) Nachkommen (F₁) präkonzeptionell mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl injizierter Weibchen, die ab der sechsten Lebenswoche für neun Wochen *ad libitum* mit einer normal-kalorischen Standarddiät (SD) oder einer hoch-kalorischen Diät (HFD) gefüttert wurden; dargestellt ist die durchschnittliche Blutglukosekonzentration (mg/dL) nach 16 stündigem Fasten, welche für die einzelnen Tiere in Doppelwerten bestimmt wurde (Gruppenmittelwert mit Standardfehler; n=6-11). Statistisch signifikante Unterschiede wurden abhängig vom Ergebnis eines Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung paarweise mittels t-test bzw. Mann-Whitney-Test ermittelt und nach manueller Bonferroni-Korrektur gegen die Anzahl der im Experiment untersuchten Zeitpunkte (A=1 nur basal; B-D=3 basal, 30 min, 60 min) mit Sternchen gekennzeichnet (*, p<0,05, **, p<0,01, ***, p<0,001). Abbildung 15A erstellt basierend auf Daten erhoben in Kooperation mit L. G.

Vergleichbare Resultate konnte auch L. G. im Rahmen ihrer Bachelorarbeit in einem Versuch ohne besondere Diät für Böcke ermitteln, die im Alter von sechs bis acht Wochen mit TCPOBOP (3mg/kg) oder Maiskeimöl injiziert wurden und 12 Wochen später auf ihren basalen Blutzucker untersucht wurden. Ergänzend erfolgte in ihrem Experiment eine weitere Messung bereits eine Woche nach Exposition, welche eine signifikante Abnahme der basalen Blutglukose nach CAR-Aktivierung zeigt (vgl. Abb. 15A).

Im weiteren Verlauf der GTTs wurden der rasche Anstieg des Blutzuckers nach der Applikation eines Bolus Glukoselösung sowie der darauf folgende stoffwechselvermittelte Rückgang auf Ausgangsniveau durch wiederholte Messungen über einen Zeitraum von 2h verfolgt. Unterschiede in der Glukosetoleranz sind dabei insbesondere an der maximalen Höhe des Blutzuckerwerts und anhand der Geschwindigkeit der Abnahme zu erkennen. Entsprechend wurden zur Auswertung nachfolgend nicht nur die Verlaufskurven genutzt (vgl. Abb. 16), sondern auch vergleichende Analysen zu den relevanten Zeitpunkten; für die Untersuchung des Maximums wurden die nach 30 Minuten gemessenen Werte genutzt (vgl. A3 Abb. A 6), für den Rückgang die nach 60 Minuten ermittelten (vgl. A3 Abb. A 6).

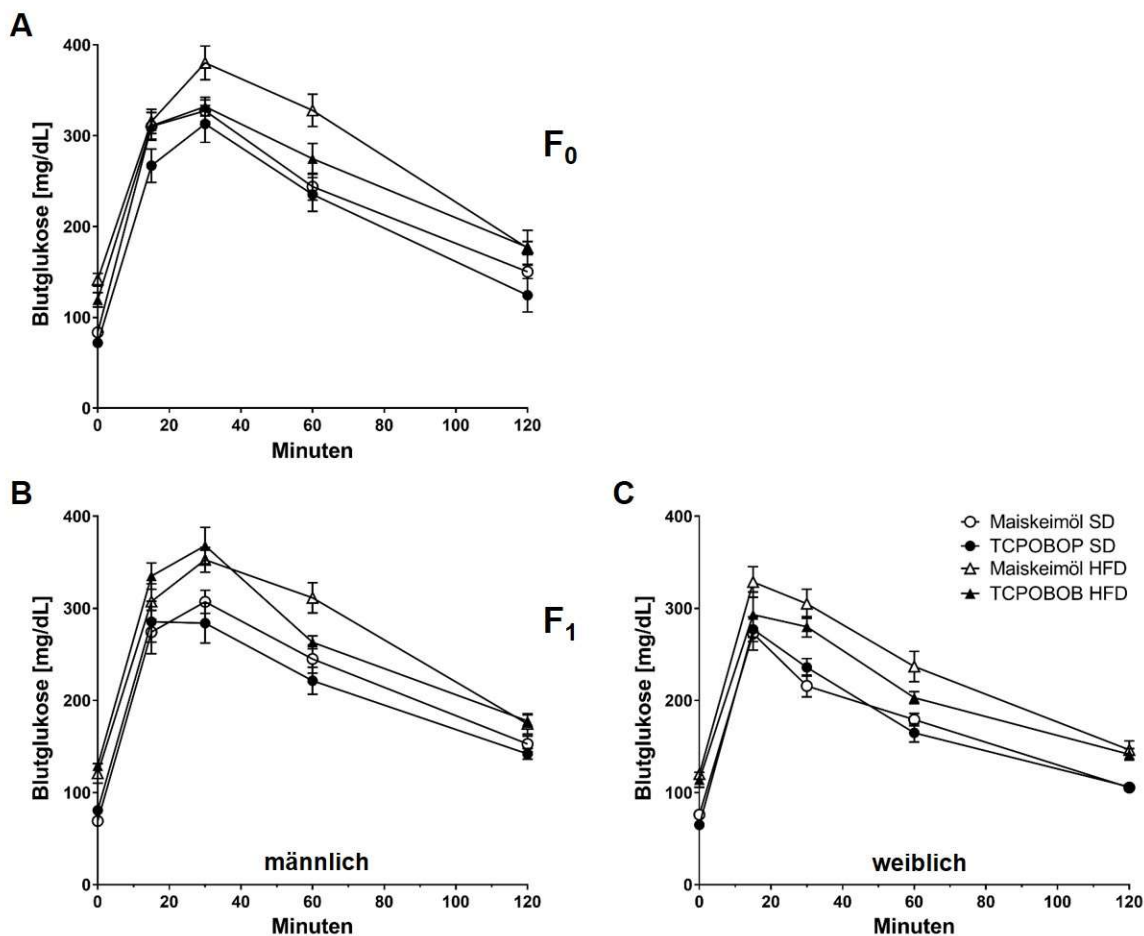


Abb. 16: Glukosetoleranztests (GTTs) TCPOBOP vorbehandelter Mäuse und ihrer Nachkommen

Blutglukose Messungen über Nacht gefasteter Mäuse im Verlauf von 2 h nach Injektion eines Bolus 10%iger Glukoselösung (2g/kg - berechnet anhand des geschlechtsspezifischen Durchschnittsgewichts der SD Tiere). Die Messungen erfolgten in Doppelwerten mit dem CONTOUR® XT Blutzuckermessgerät vor Injektion der Zuckerlösung sowie 15, 30, 60 und 120 min danach (A) Männliche F_0 Mäuse, die im Alter von sechs Wochen mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl injiziert und nachfolgend für neun Wochen *ad libitum* mit einer normal-kalorischen Standarddiät (SD) oder einer hochkalorischen Diät (HFD) gefüttert wurden, (B+C) Männliche (B) und weibliche (C) Nachkommen (F_1) präkonzeptionell mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl injizierter Weibchen, die ab der sechsten Lebenswoche für neun Wochen *ad libitum* mit einer normal-kalorischen Standarddiät (SD) oder einer hochkalorischen Diät (HFD) gefüttert wurden; dargestellt sind die durchschnittlichen Verlaufskurven des Glukosetoleranztests der einzelnen Diät- und Behandlungsgruppen, welche anhand der Glukosekonzentrationen zu den fünf Messzeitpunkten erstellt wurden (Gruppenmittelwert mit Standardfehler; F_0 n=7-8; F_1 männlich n=9; F_1 weiblich n=6-11). Die einzelnen nach Diät getrennten Versuchsgruppen sind durch identische Symbole

gekennzeichnet, wobei diese für TCPOBOP ausgefüllt und für Maiskeimölkontrollen ungefüllt sind. Die statistischen Analysen wurden nicht anhand der Verlaufskurven, sondern ausgehend von den Blutglukosewerten der einzelnen Messungen durchgeführt (vgl. Abb. 15 [0 min] und Anhang A3 Abb. A 6 [30 min + 60 min]).

Bei der Verlaufsanalyse fällt über alle Gruppen hinweg auf, dass die mit HFD gefütterten Tiere nicht nur gesteigerte basale Werte, sondern auch höhere Maxima und leicht erhöhte Endkonzentrationen haben als die mit Standarddiät ernährten Tiere. In der F₀ Generation ist in den mit TCPOBOP vorbehandelten Böcken der HFD Gruppe nach 30 Minuten ein deutlich verminderter Anstieg (TCPOBOP: 332 mg/dL, Maiskeimöl: 380 mg/dL; p=0,119; vgl. Abb. 16A und A3 Abb. A 6A) sowie nach 60 Minuten entsprechend erniedrigte Werte im Vergleich zur Maiskeimölkontrolle zu erkennen (TCPOBOP: 275 mg/dL, Maiskeimöl: 328 mg/dL; p=0,144; vgl. Abb. 16A und A3 Abb. A 6B). Die parallel analysierte SD Gruppe liegt im Versuchsverlauf zwar ebenfalls konstant unter der Kontrolle, die Einzelanalysen zeigen aber nahezu keine Unterschiede mehr (vgl. A3 Abb. A 6 A+B). Ähnlich verhält es sich auch bei den mit SD gefütterten F₁ Männchen und Weibchen. Im Vergleich dazu erreichen die HFD F₁ Männchen beider Behandlungsgruppen zwar annähernd gleiche Maximalkonzentrationen (~360 mg/dL; vgl. Abb. 16B und A3 Abb. A 6C), doch der Blutzucker der TCPOBOP vorbehandelten Tieren sinkt nachfolgend signifikant schneller als in den Kontrollen (TCPOBOP: 263 mg/dL, Maiskeimöl: 311 mg/dL; vgl. Abb. 16B und A3 Abb. A 6D). Die Glukosewerte der induzierten HFD F₁ Weibchen hingegen liegen - trotz nahezu identischer Basal- und Endkonzentrationen - über den gesamten Versuchsverlauf hinweg im Mittel 12% unter denen der Lösungsmittelkontrollen (vgl. Abb. 16C, A3 Abb. A 6E+F).

Die durch CAR-Aktivierung auftretenden Veränderungen in der Glukosehomöostase werden im Allgemeinen auf eine Hemmung der Glukoneogenese vermittelt durch die verminderte hepatische Expression der Schlüsselenzyme Glukose-6-phosphatase (G6Pc) und Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (Pck1) zurückgeführt (Dong *et al.* 2009b, Lynch *et al.* 2014, Miao *et al.* 2006, Rezen *et al.* 2009, Ueda *et al.* 2002) (vgl. 1.4). Von L. R. im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführte ergänzende Expressionsuntersuchungen zeigen sowohl Pck1 (vgl. Abb. 17A) als auch G6P (vgl. Abb. 17B) in neun Wochen zuvor mit TCPOBOP behandelten Böcken - unabhängig von der Diät - anhaltend signifikant reduziert. Generationsübergreifend ist dieser Effekt jedoch nicht mehr zu erkennen und scheint sich in einigen Versuchsgruppen tendenziell sogar umzukehren (vgl. Abb. 17C-F). Neben diesen behandlungsbedingten Unterschieden fällt insbesondere für Pck1 in allen Gruppen eine deutliche – wenn auch nicht signifikante - Reduktion der Expression unter hochkalorischer Diät im Vergleich zum normal-kalorischen Kontrollfutter auf.

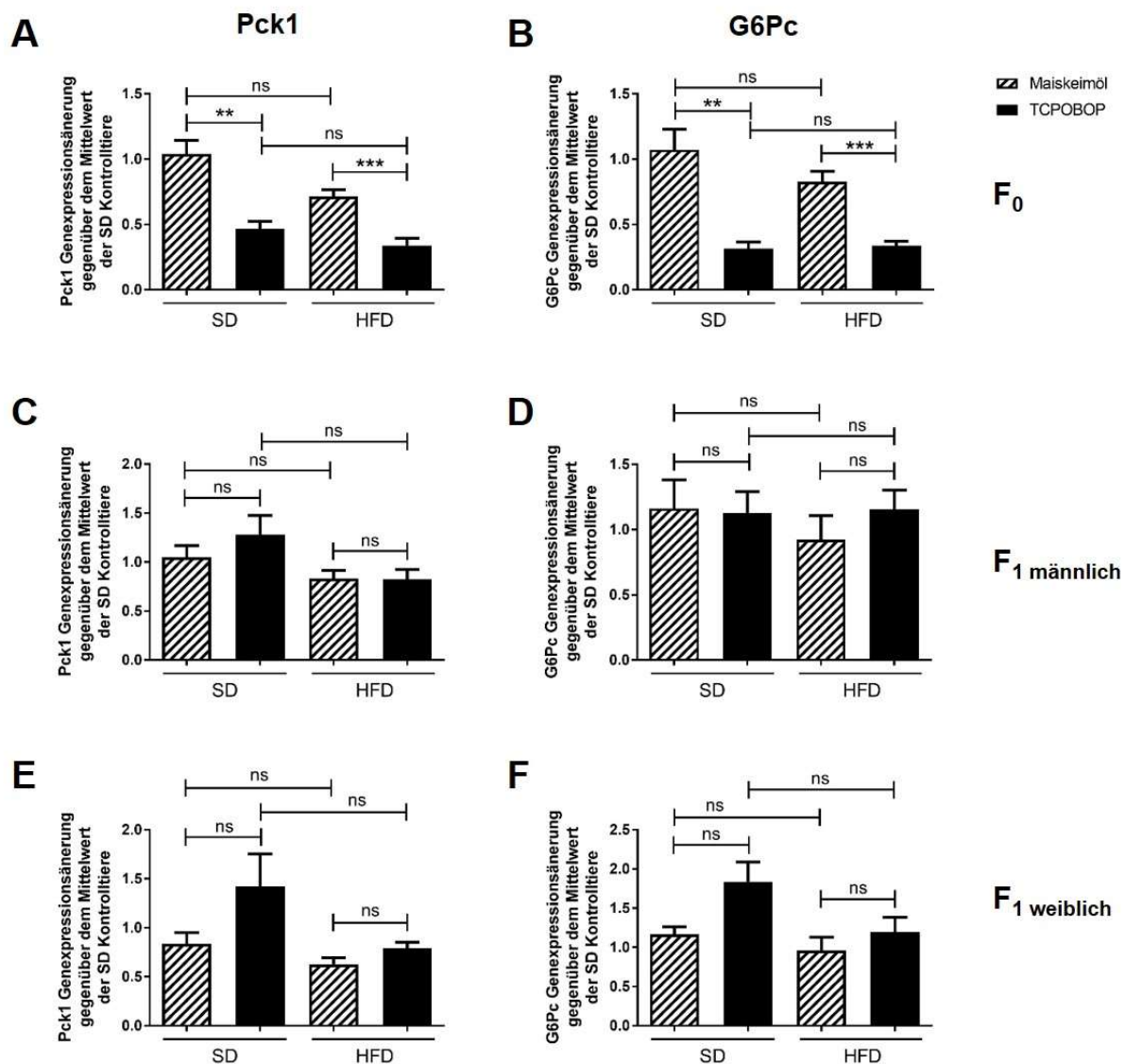


Abb. 17: Expressionsanalysen der Gluconeogenese-Schlüsselenzyme G6P (G6Pc) und PEPCK (Pck1) in der Leber von TCPOBOP vorbehandelten Mäusen und ihren Nachkommen

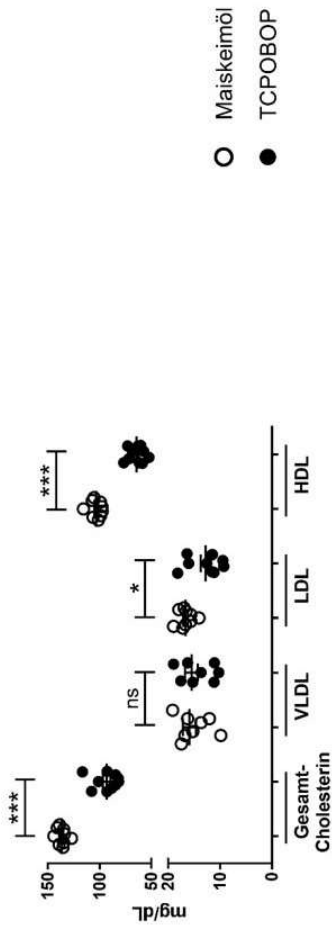
Hepatische Genexpressionsanalysen von (A+B) männlichen F₀ Mäusen, die im Alter von sechs Wochen mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl injiziert und nachfolgend für neun Wochen ad libitum mit einer normal-kalorischen Standarddiät (SD) oder einer hoch-kalorischen Diät (HFD) gefüttert wurden sowie (C-F) männlichen (C+D) und weiblichen (E+F) Nachkommen (F₁) präkonzeptionell mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl injizierter Weibchen, die ab der sechsten Lebenswoche für neun Wochen ad libitum mit einer normal-kalorischen Standarddiät (SD) oder einer hoch-kalorischen Diät (HFD) gefüttert wurden; Die hepatische G6Pc und Pck1 mRNA Expression wurde mittels SYBR qPCR und $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode ermittelt. Dargestellt sind die Genexpressionsänderungen gegenüber dem Mittelwert der mit Standarddiät gefütterten Tiere der Lösungsmittelkontrolle (Mittelwert mit Standardfehler; F₀ n=7-8; F₁ männlich n=9; F₁ weiblich n=6-11). Statistisch signifikante Unterschiede wurden abhängig vom Ergebnis eines Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung paarweise mittels t-test bzw. Mann-Whitney-Test ermittelt und nach manueller Bonferroni-Korrektur gegen die Anzahl der im Experiment untersuchten Gene (5; G6Pc, Pck1, Ppar α , Srebf1, ApoA1) mit Sternchen gekennzeichnet (**, p<0,01, ***, p<0,001). Abbildung erstellt basierend auf Daten erhoben in Kooperation mit L. R.

Kurz nach CAR-Aktivierung durch TCPOBOP treten im Nagermodell neben Abweichungen in der Glukosehomöostase auch positive Veränderungen der Serumlipidzusammensetzung wie die signifikante Abnahme von Gesamt- (Kobayashi *et al.* 2015), LDL- (Rezen *et al.* 2009) und HDL-Cholesterin (Chai *et al.* 2016, Masson *et al.* 2008) auf (vgl. Abb. 18A). Lediglich die VLDL-Cholesterin Konzentration zeigt sich in den von Prof. Dr. E. B. am Institut für experimentelle Biomedizin des Universitätsklinikums Würzburg durchgeführten Serumlipidanalysen adulter Böcke eine Woche nach Injektion von TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl unverändert. Vergleichbare Resultate liefern auch die Untersuchungen der Cholesterinprofile der in den GTTs verwendeten mit TCPOBOP vorbehandelten und nachfolgend für neun Wochen mit hoch- oder normal-kalorischer Diät gefütterten Böcke (vgl. Abb. 18B-E). Sowohl Gesamtcholesterin (vgl. Abb. 18B) als auch HDL (vgl. Abb. 18C) und LDL (vgl. Abb. 18D) bleiben demnach nachweislich diätunabhängig reduziert.

Auf Grund der generell sehr niedrigen Konzentration ist VLDL häufig nicht detektierbar. Die daraus resultierenden kleinen Gruppengrößen führen dazu, dass teilweise keine statistische Auswertung der nach TCPOBOP im Mittel zu erkennenden Konzentrationsverringerng erfolgen konnte (vgl. Abb. 18E).

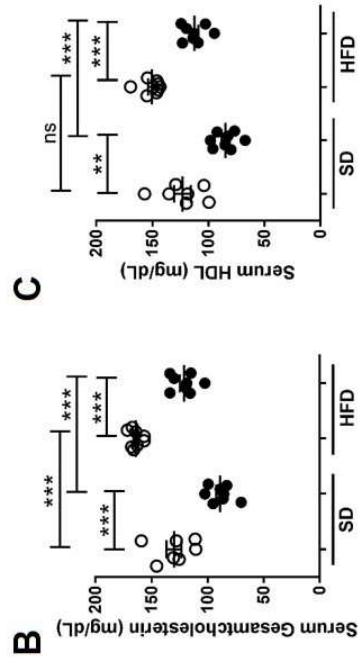
Beide Geschlechter der F₁ Generation zeigen konsistent diätunabhängig für alle gemessenen Cholesterinfraktionen tendenziell reduzierte Werte in den TCPOBOP Gruppen, wobei die männlichen Tiere über alle Parameter hinweg etwa doppelt so hohe Konzentrationen aufweisen. Auf Grund der Redundanz sind in Abbildung 18 nur die weiblichen Nachkommen dargestellt; die Beschreibungen treffen jedoch - wenn nicht explizit erwähnt - auch auf die Böcke zu. Während der Rückgang der Serumkonzentration für VLDL (vgl. Abb. 18I) nur als Trend nachzuweisen ist, erreicht er für Gesamtcholesterin (vgl. Abb. 18F) und HDL (vgl. Abb. 18G) in den mit hochkalorischer Diät ernährten weiblichen Mäusen, sowie für LDL (vgl. Abb. 18H) in den mit Standarddiät gefütterten Weibchen sogar Signifikanz. Die Resultate der männlichen Wurfgeschwister hingegen sind inhomogener und streuen stärker, wodurch sie keine Signifikanz erreichen.

A
F₀-Generation männlich
1 Woche nach TCPOBOP
[keine besondere Diät]

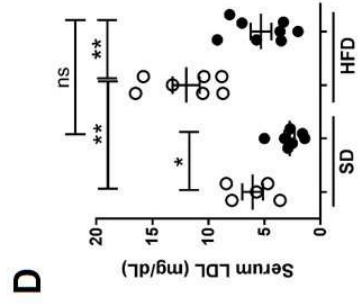


A

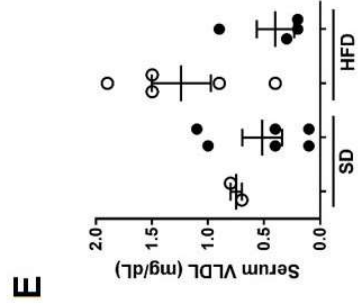
B
F₀-Generation männlich
9 Wochen nach TCPOBOP
[9 Wochen SD/HFD]



B

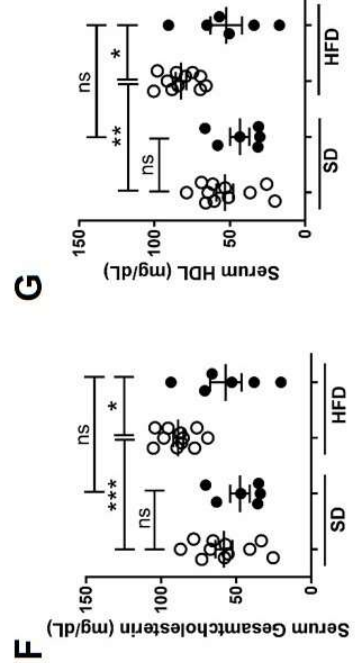


D

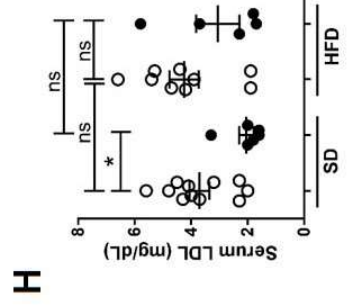


E

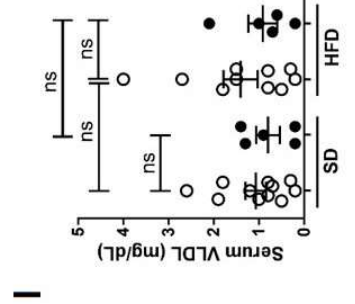
F
F₁-Generation weiblich
15 Wochen alt
[9 Wochen SD/HFD]



F



H



I

Abb. 18: Größenausschlusschromatographische Analyse der Serumcholesterol-Konzentrationen TCPOBOP vorbehandelter Mäuse und ihrer Nachkommen

HDL-, LDL-, VLDL- und Gesamtcholesterin Konzentrationen im Serum von (A) neun Wochen alten Böcken (n =9-10) eine Woche nach der Injektion von TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl [keine besondere Diät], (B-E) männlichen F₀ Mäusen (n=5-8; VLDL n= 2-6), die im Alter von sechs Wochen mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl injiziert und nachfolgend für neun Wochen ad libitum mit einer normalkalorischen Standarddiät (SD) oder einer hochkalorischen Diät (HFD) gefüttert wurden, (F-I) weiblichen Nachkommen (F₁, n=5-11) präkonzeptionell mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl injizierter Weibchen, die ab der sechsten Lebenswoche für neun Wochen ad libitum mit einer normalkalorischen Standarddiät (SD) oder einer hochkalorischen Diät (HFD) gefüttert wurden; dargestellt sind die durchschnittlichen Serumkonzentrationen (mg/dL) nach 16-stündigem Fasten bestimmt durch HPLC-Größenausschlusschromatographie (Gruppenmittelwert mit Standardfehler). Statistisch signifikante Unterschiede wurden abhängig vom Ergebnis eines Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung paarweise mittels t-test bzw. Mann-Whitney-Test ermittelt und nach manueller Bonferroni-Korrektur gegen die Anzahl der im Experiment untersuchten Serum-Parameter (4, Gesamtcholesterin, HDL, LDL, VLDL) mit Sternchen gekennzeichnet (*, p<0,05, **, p<0,01, ***, p<0,001). Für (E) wurden auf Grund der geringeren Gruppengröße (n=2-6) keine statistischen Analysen vorgenommen.

Die genaue Ursache der nach CAR-Aktivierung auftretenden Abweichungen des Serumlipidprofils ist bislang unklar. Neben Veränderungen der billären Exkretion (Yan *et al.* 2015) konnte nach TCPOBOP Exposition auch die transkriptionelle Repression einiger zentraler Regulatoren des Fettstoffwechsels wie ApoA1, Srebf1 und PPAR α festgestellt werden (Lynch *et al.* 2014, Masson *et al.* 2008, Rezen *et al.* 2009). Von L. R. im Rahmen ihrer Masterarbeit ergänzend zu den Serumanalysen durchgeführte quantitative PCR-Analysen zeigen anhaltend eine signifikante Verminderung der Expression von PPAR α und Srebf1 bei TCPOBOP exponierten Tieren (vgl. A3 Abb. A 7A+B). Vergleichbar mit den untersuchten Gluconeogenese-Schlüsselenzymen ist dieser Effekt generationsübergreifend jedoch nicht mehr zu erkennen und scheint sich tendenziell sogar umzukehren (vgl. A3 Abb. A 7C-F). Ähnlich scheint es sich auch für das Apolipoprotein von HDL ApoA1 zu verhalten. Obwohl sowohl eine Woche nach TCPOBOP Injektion (vgl. Abb. 19A) als auch 8 Wochen später (vgl. Abb. 19B) keine Veränderung der Expression detektierbar ist, kommt es nach 12 Wochen zu einer signifikanten Reduktion der ApoA1 mRNA (vgl. Abb. 19C). In der F₁ Generation (vgl. Abb. 19D-F) zeigt sich erneut ein diätunabhängiger Trend zur Expressionserhöhung, welcher unter hochkalorischer Ernährung sogar Signifikanz erreicht (vgl. Abb. 19E+F).

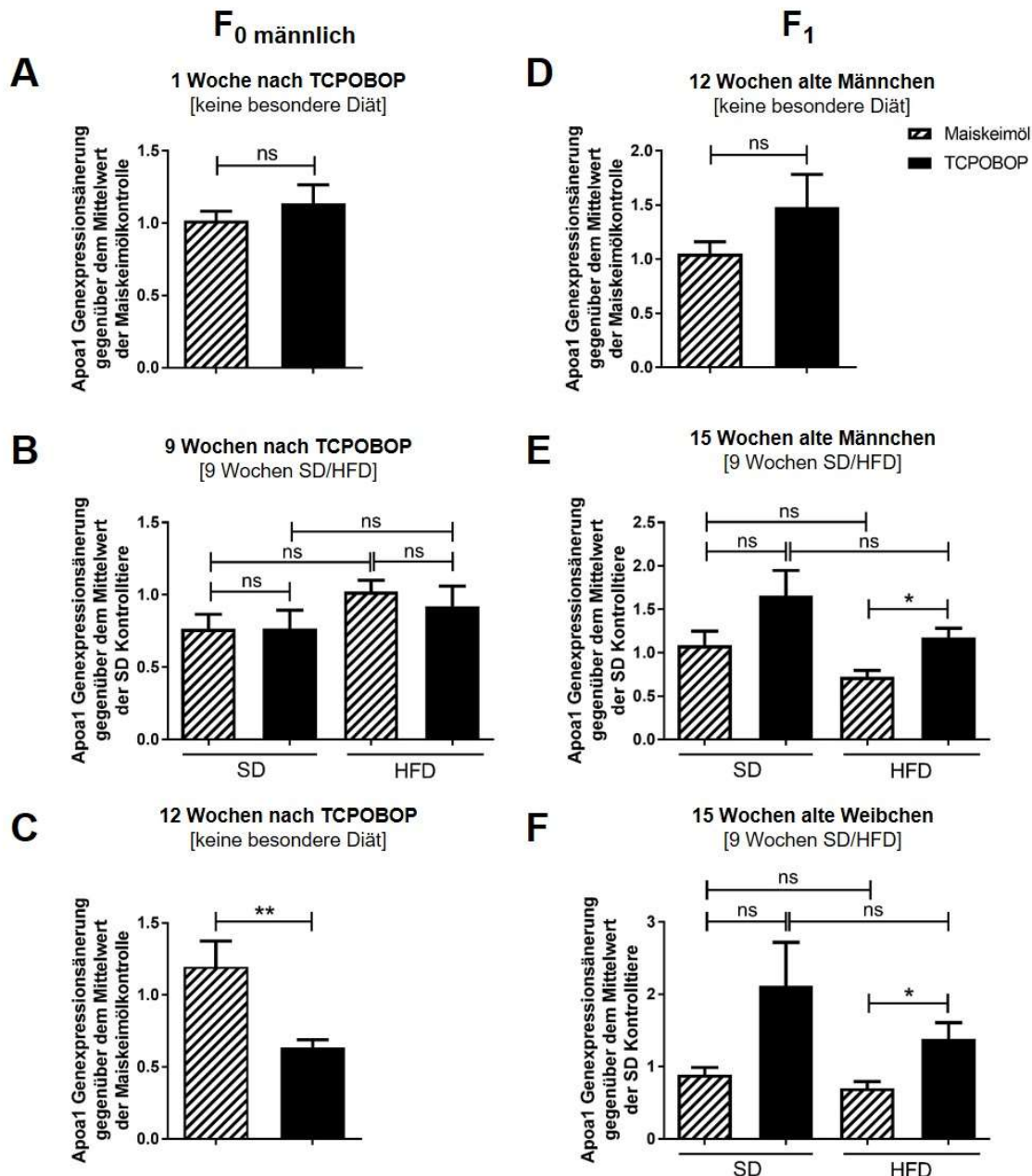


Abb. 19: Expressionsanalysen des HDL-Apolipoproteins ApoA1 in der Leber mit TCPOBOP vorbehandelter Mäuse und ihrer Nachkommen

Hepatische Genexpressionsanalysen von (A+C) adulten Böcken (n=10) eine Woche (A) und 12 Wochen (C) nach der Injektion von TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl im Alter von 8 Wochen [keine besondere Diät], (B) männlichen F₀ Mäusen (n=9-10), die im Alter von sechs Wochen mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl injiziert und nachfolgend für neun Wochen ad libitum mit einer normal-kalorischen Standarddiät (SD) oder einer hoch-kalorischen Diät (HFD) gefüttert wurden, (D) zwölf Wochen alten männlichen Nachkommen (F₁) präkonzeptionell einmalig mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl behandelte adulter weiblicher Mäuse (n=4-10) [keine besondere Diät] sowie (E+F) männliche (n=9; E) und weibliche (n=6-11; F) Nachkommen (F₁) präkonzeptionell mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl injizierter Weibchen, die ab der sechsten Lebenswoche für neun Wochen ad libitum mit einer normal-kalorischen Standarddiät (SD) oder einer hoch-kalorischen Diät (HFD) gefüttert wurden; Die hepatische ApoA1 mRNA Expression wurde mittels SYBR qPCR und $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode ermittelt. Dargestellt sind die Genexpressionsänderungen gegenüber dem Mittelwert der (mit Standarddiät gefütterten) Lösungsmittelkontrolle (Mittelwert mit Standardfehler). Statistisch signifikante Unterschiede wurden abhängig vom Ergebnis eines Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung paarweise mittels t-test bzw. Mann-Whitney-Test ermittelt und nach manueller Bonferroni-Korrektur gegen die Anzahl der im Experiment untersuchten Gene (5; G6Pc, Pck1, Ppara, Sreb1, ApoA1) mit Sternchen gekennzeichnet (*, p<0,05, **, p<0,01). Abbildung erstellt basierend auf Daten erhoben in Kooperation mit L. R.

3.3 Mechanismus der Übertragung

Die von Frau Dr. Marianne Mathäs im Rahmen Ihrer Promotion (Mathäs 2014) nachgewiesene multigenerationale Übertragung in die Nachkommen exponierter Weibchen (vgl. Abb. 4D) könnte auf die Einführung stabiler epigenetischer Veränderungen in den Keimzellen (Chen *et al.* 2012) oder auf die Akkumulation des hochpotenten, lipophilen Liganden TCPOBOP im Fettgewebe (Poland *et al.* 1980, Smith *et al.* 1993) und sukzessive Übertragung durch die Plazenta bzw. Muttermilch zurückzuführen sein. Die im Folgenden beschriebenen Versuche sollten eine klare Differenzierung zwischen beiden Hypothesen und somit die Aufklärung des zu Grunde liegenden Mechanismus ermöglichen.

3.3.1 Untersuchungen zur Übertragung durch die männliche Keimbahn

Die Ergebnisse der Arbeit von Frau Dr. Marianne Mathäs (2014) lassen vermuten, dass die multigenerationale Übertragung ausschließlich innerhalb der weiblichen Linie möglich ist. Da die Spermatogenese jedoch ein komplexer Prozess mit zahlreichen verschiedenen Entwicklungsstadien ist (vgl. 2.3.7, Abb. 5), wäre es möglich, dass durch den bislang gewählten Verpaarungszeitpunkt lediglich das Xenobiotika-sensitive Fenster der Keimzellentwicklung verpasst wurde. Um die Möglichkeit einer Übertragung durch die männliche Keimbahn über die gesamte Gametogenese und alle vier Keimzellstadien (Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden, reife Spermien) hinweg zu untersuchen, wurden mit TCPOBOP (3 mg/kg) behandelte Böcke zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Exposition mit unbehandelten Weibchen verpaart und somit Spermien zur Befruchtung genutzt, die sich beim Kontakt mit TCPOBOP in unterschiedlichen Stadien der Spermatogenese befanden.

Die von T. G. im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführten Cyp2b10-TaqMan-Analysen zeigen keine Expressionsunterschiede für die Nachkommen, welche auf exponierte Spermatiden (Verpaarung nach 3 Tagen; vgl. Abb. 20A) oder Spermatogonien (Verpaarung nach 31 Tagen; vgl. Abb. 20B) zurückzuführen sind. Lediglich die F₁ Mäuse, welche aus der Befruchtung von Eizellen mit Spermien entstanden sind, die zum Zeitpunkt der TCPOBOP-Behandlung Spermatozyten waren (Verpaarung nach 19 Tagen; vgl. Abb. 20B), zeigen eine etwa dreifach erhöhte hepatische Cyp2b10 Expression, welche für die männlichen Tiere sogar Signifikanz erreicht. Die ergänzend zehn Wochen nach Injektion gemessene 150-fach erhöhte Expression von Cyp2b10 in den Zuchtböcken (vgl. Abb. 20D) belegt die erfolgreiche Induktion der F₀ Generation.

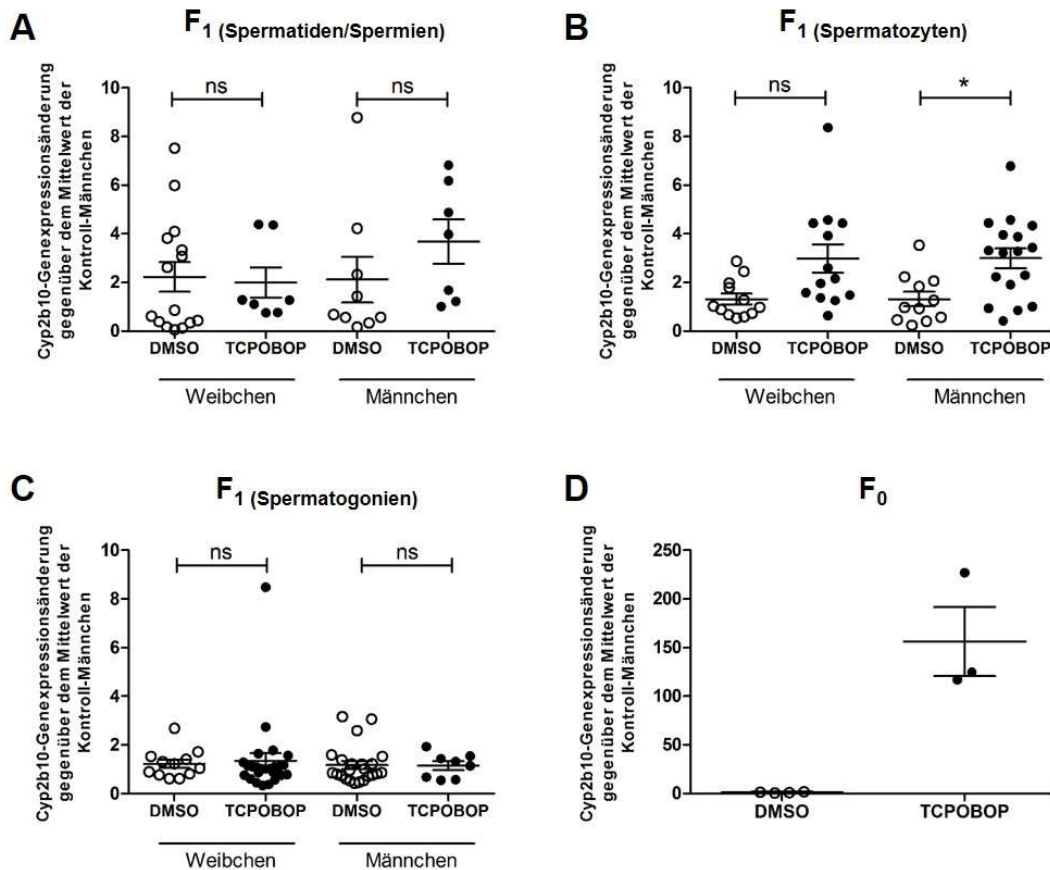


Abb. 20: Induktions- und Transmissionspotential der verschiedenen Stadien der männlichen Gametogenese

Um alle vier Keimzellstadien hinsichtlich ihres Induktions- und Transmissionspotentials zu untersuchen wurden adulte trainierte C57BL/6 Böcke mit TCPOBOP (3mg/kg) oder dem Lösungsmittel DMSO/Maiskeimöl (10/90) behandelt und 3 (A), 19 (B) und 31 Tage (C) danach mit unbehandelten Weibchen verpaart, wodurch Spermien zur Befruchtung genutzt wurden, die sich bei der Exposition in unterschiedlichen Stadien der Spermatogenese befanden. Die hepatische Cyp2b10-mRNA Expression wurde in den aus den Verpaarungen hervorgehenden F₁ Mäusen im Alter von 6 Tagen (n=7-25) und zur Überprüfung der erfolgreichen Induktion auch in den Zuchtböcken (D; n=3-4) zehn Wochen nach Injektion mittels TaqMan® und $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode ermittelt. Dargestellt sind die Genexpressionsänderungen gegenüber dem Mittelwert der männlichen Tiere der Lösungsmittelkontrolle (Mittelwert mit Standardfehler); statistisch signifikante Unterschiede in der F₁ Generation wurden nach einem Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-hoc Test (A-C) ermittelt und mit Sternchen gekennzeichnet (*, P<0,05); Für die Zuchtböcke (D) erfolgten auf Grund der kleinen Gruppengröße keine statistischen Analysen. Abbildung erstellt basierend auf Daten erhoben in Kooperation mit T. G.

3.3.2 Differenzierung zwischen prä- und postkonzeptioneller Exposition

Um eine eindeutige Differenzierung zwischen präkonzeptionellen epigenetischen Veränderungen auf Keimzellebene und postkonzeptionellen Effekten durch intrauterine oder postnatale Exposition zu ermöglichen wurden in-vitro-Fertilisationen (IVF) und Embryotransfer-Experimente (ET) durch veterinärmedizinisch geschultes Fachpersonal des TARC durchgeführt (vgl. Abb. 6).

Zunächst war geplant die Versuche auf einem reinen C57BL/6 Hintergrund durchzuführen, obwohl normalerweise CD1 Weibchen auf Grund ihrer sehr guten Zuchtqualitäten als Ammen

bei derartigen Experimenten genutzt werden. Erste Testtransfers zeigten jedoch, dass C57BL/6 Weibchen nach der üblichen Implantation von 20-26 Zweizellembryonen sehr wenige lebende Nachkommen zur Welt bringen (vgl. Tab. 9). Bei genauerer Analyse wurde klar, dass diese schlechte Transfer-Effizienz von 18% nicht auf eine geringe Angangsrate der Embryonen in der Leihmutter zurückzuführen ist, sondern auf eine sehr hohe Anzahl schwerwiegender Geburtskomplikationen (67%). Die Angangsrate lag im Schnitt bei 59%, so dass aus einem Transfer im Schnitt etwa 11-15 Föten hervorgingen. Bedenkt man die durchschnittliche natürliche Wurfgröße von C57BL/6 Weibchen, welche im Mittel bei 6 Jungtieren liegt (vgl. Tab. 9), wird klar, dass die Anzahl der Föten für die Weibchen viel zu hoch ist. Die Muttertiere scheinen den enormen physischen Belastungen der Geburt derart vieler Jungtiere nicht gewachsen zu sein.

Tab. 9: Vergleich der Ammenqualitäten von C57BL/6 und CD1 Weibchen

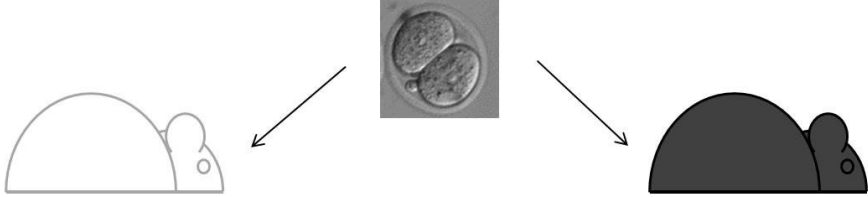
*1 berechnet anhand von je 22 Würfen unbehandelter bzw. mit Lösungsmittel-behandelter Mäuse

*2 bestimmt anhand aller Versuche mit natürlichen Geburten (CD1: 22 Würfe; C57BL/6: 90 Würfe); nur vorab unbehandelte bzw. mit Lösungsmittel-behandelte Mütter berücksichtigt; CD1 Kronismusrate auf Grund geringerer Wurfzahl vom TARC bestätigt

*3 vom TARC genannte Kennzahl

*4 Werte anhand von 6 Testtransfers ermittelt

*5 Werte anhand von 4 Testtransfers ermittelt

CD1		C57BL/6 J	
			
Standardmäßig auf Grund ihrer guten Zuchtqualitäten als Ammen genutzt		Normalerweise nicht genutzt – als schlechte Mütter mit kleineren Wurfzahlen bekannt	
Allgemeine Zuchtmerkmale			
Ø Wurfgröße*1	13	Ø Wurfgröße*1	6
Ø Kronismusrate*2	0%	Ø Kronismusrate*2	17%
Transfer von 20-26 Zweizellembryonen			
Standardmäßig angewendet		Angangsrate (Schwangerschaften)*4	59%
		Geburtskomplikationen*4	67%
Effizienz (lebende F1-Tiere)*3	~ 50 %	Effizienz (lebende F1 Tiere)*4	18%
Transfer von 11 Zweizellembryonen			
nicht getestet		Angangsrate (Schwangerschaften)*5	30%
		Geburtskomplikationen*5	0%
		Effizienz (lebende F1 Tiere)*5	27%

Zur Kontrolle dieser Hypothese wurden weitere Tests durchgeführt, bei denen nur 11 Zweizellembryonen transferiert wurden, was bei gleichbleibender Angangsrate etwa den üblichen 6 Föten entsprechen würde. Erwartungsgemäß blieben Geburtskomplikationen in diesen Versuchen aus. Allerdings sank auch die Angangsrate auf rund 30%, so dass

letztendlich auch nur 27% der Embryonen zu lebenden Jungtieren heranwachsen. Da CD1 Weibchen im Vergleich eine Transfereffizienz von rund 50% zeigen (Angabe des TARC), mit durchschnittlich 13 Föten (vgl. Tab. 9) deutlich größere Würfe und im Verhältnis ein geringeres Kronismus-Risiko (vgl. Tab. 9) haben, wurden die Versuche nach einem erfolgreichem Test auf Cyp2b10-Induzierbarkeit in CD1 Mäusen (vgl. A3 Abb. A 8) mit C57BL/6 Spendermüttern und CD1 Ammen durchgeführt.

Unabhängig vom angewandten Verfahren (IVF oder ET) erfolgte die Abgrenzung zwischen präkonzeptionellen epigenetischen Veränderungen und postkonzeptionellen Effekten durch Transfers zwischen reziprok vorbehandelten Spendermüttern und Ammen (vgl. 2.3.8, Abb. 6). Bei der zunächst durchgeführten IVF gelang es leider nicht, lebende Jungtiere beider reziproker Versuchsgruppen sowie der zum Ausschluss methodisch bedingter Effekte mitgeführten nicht-reziproken Positiv- und Negativ-Kontrollen zu erhalten (vgl. 2.3.8, Abb. 6). Um dennoch erste Schlüsse aus dem Versuch ziehen zu können, wurde die hepatische Cyp2b10 Expression der beiden geglückten Gruppen mittels TaqMan mit natürlich gezeugten und geborenen Nachkommen von präkonzeptionell einmalig mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl behandelten adulten weiblichen C57BL/6 Mäusen verglichen (vgl. Abb. 21B). Dabei zeigen die externen Kontrollen wie erwartet eine massive Induktion (ca. 1200-fach) von Cyp2b10 in der Leber der Nachkommen mit TCPOBOP vorbehandelter Weibchen. Jungtiere, welche aus den Oozyten induzierter Spendermüttern hervorgehen und von ebenfalls exponierten CD1 Ammen ausgetragen werden (TzT), weisen eine ca. 600-fach gesteigerte Cyp2b10 Expression auf; Nachkommen derselben Spendermütter, welche von nicht-induzierten Leihmüttern ausgetragen werden (TzM) hingegen nur eine etwa 5fache Erhöhung. Da dieses Verhältnis auf eine eher untergeordnete Rolle der präkonzeptionellen Umgebung hindeutet, wurden zur Wiederholung des Versuchs Embryotransfers, welche im TARC routinemäßig durchgeführt werden, anstatt der selten angewandten in-vitro-Fertilisationen genutzt.

Die Embryotransfers bestätigen das Ergebnis der IVF (vgl. Abb. 21A). Während die hepatische Cyp2b10 Expression der Nachkommen der Transfer-Positivkontrolle (TzT) massiv erhöht ist (ca. 700-fach), zeigt die Transfer-Negativkontrolle (MzM) wie erwartet keine Anzeichen für eine methodisch bedingte Induktion. Die Expression der Jungtiere, welche aus den Embryonen induzierter Spendermüttern hervorgehen und von nicht-induzierten Leihmüttern ausgetragen werden (TzM), erscheint in diesem Versuch sogar völlig unverändert und unterscheidet sich auch in der statistischen Analyse nicht von der Negativkontrolle. Der reziproke Transfer von Embryonen nicht-induzierter Spendermütter in induzierte Ammen (MzT) hingegen resultiert in einer 650-fachen Erhöhung der Cyp2b10 Expression, die statistisch nicht von der Positivkontrolle abweicht. Die übergeordnete Rolle des Induktionsstatus der Amme legt nahe,

dass die Transmission der Cyp2b10 Induktion nach TCPOBOP postkonzeptionell durch direkten intrauterinen Kontakt während der Schwangerschaft oder im Verlauf der Brutpflege über die Muttermilch erfolgt.

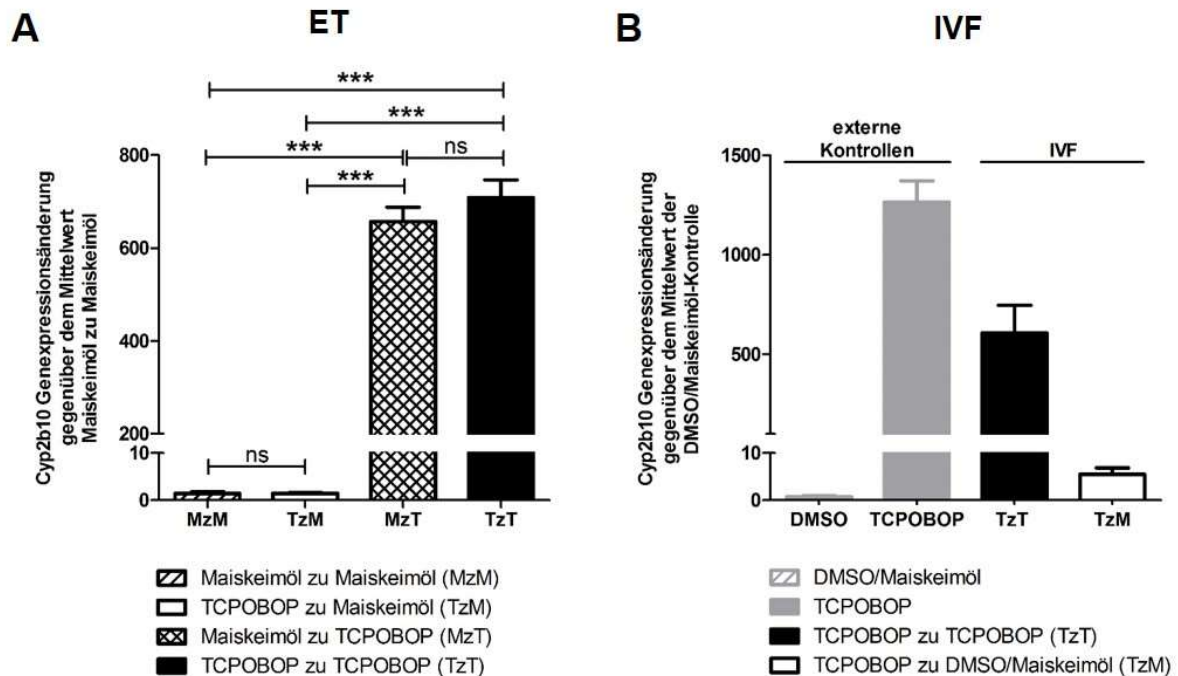


Abb. 21: In-vitro-Fertilisations- (IVF) und Embryotransfer-Experimente (ET) zur Differenzierung zwischen prä- und postkonzeptioneller Übertragung der Cyp2b10 Induktion

In-vitro-Fertilisationen (B) und Embryotransfers von Zweizellembryonen (A) zwischen reziprok vorbehandelten Spendermüttern und Ammen; C57BL/6 Spendermütter wurden mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Lösungsmittel vorbehandelt und 3-4 Wochen später superovuliert; aus den Eileiterampullen wurden (A) Zygoten – nach natürlicher Verpaarung (B) Oozyten für die in-vitro-Fertilisation gewonnen. Nach Kultivierung wurden je 20-26 Zweizellembryonen in die Eileiter von Tag 0,5 scheinsschwangeren CD1 Ammen eingebracht, welchen eine Woche vor dem Transfer TCPOBOP (3 mg/kg) oder das Lösungsmittel injiziert worden war. Neben reziproken Transfers erfolgten auch nicht-reziproke Transfer-Kontrollen. (B) Auf Grund fehlender Gruppen wurden externe Kontrollen zur Auswertung benötigt: Nachkommen präkonzeptionell mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder dem Lösungsmittel (DMSO/Maiskeimöl [10/90]) behandelte adulter C57BL/6 Weibchen; die hepatische Cyp2b10-mRNA Expression wurde in den F₁ Mäusen im Alter von 6 Tagen mittels TaqMan® und $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode ermittelt. Dargestellt sind die Genexpressionsänderungen gegenüber (A) dem Mittelwert der Negativkontrolle (MzM; n=29-50) bzw. (B) dem Mittelwert der externen Negativkontrolle (DMSO; n=3) (Mittelwert mit Standardfehler); statistisch signifikante Unterschiede in (A) wurden nach einem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-hoc Test ermittelt und mit Sternchen gekennzeichnet (***, p<0,001); für (B) erfolgten auf Grund der kleinen Gruppengröße keine statistischen Analysen.

3.3.3 Differenzierung zwischen prä- und postnataler Exposition

Die weiterführende Charakterisierung der postkonzeptionellen Übertragung der Cyp2b10 Induktion erfolgte durch Fremdpflegeversuche, welche eine Differenzierung zwischen intrauteriner und Muttermilch-vermittelter Exposition ermöglichen. Ähnlich den Embryotransfers wurden dafür per Kaiserschnitt entbundene Jungtiere CD1 Ammen untergelegt, welche reziprok zu den C57BL/6 Müttern vorbehandelt wurden. Die untergeschobenen Neugeborenen wurden daraufhin für sechs Tage gemeinsam mit einigen

verbliebenen Nachkommen der Amme gesäugt, so dass sie prä- und postnatal von Müttern mit unterschiedlichem Induktionsstatus versorgt wurden.

Während die hepatische Cyp2b10 Expression der Jungtiere, welche induzierte Mütter und Ammen hatten (TzT; vgl. Abb. 22A), erwartungsgemäß massiv erhöht ist (ca. 6400fach), zeigt die Negativkontrolle (MzM) keinerlei Anzeichen für eine Induktion. Die Expression der Jungtiere, welche von exponierten Müttern ausgetragen wurden und post-natal von Ammen versorgt wurden, denen vorab Maiskeimöl injiziert wurde (TzM), erscheint geringfügig gesteigert (77-fach), unterscheidet sich allerdings in der statistischen Analyse nicht von der Negativkontrolle. Die reziproke Adoption Neugeborener von nicht-induzierten Müttern durch mit TCPOBOP behandelte Ammen (MzT) hingegen resultiert in einer 5300-fachen Erhöhung der Cyp2b10 Expression, die statistisch nicht von der Positivkontrolle abweicht. Dies deutet darauf hin, dass die Transmission primär postnatal während der Brutpflege und nur in sehr viel geringerem Ausmaß durch intrauterinen Kontakt zu TCPOBOP erfolgt. Ergänzend zu den Messungen der adoptierten C57BL/6 Jungtiere durchgeführte Analysen der gemeinsam mit ihnen gesäugten CD1 Babys (vgl. Abb. 22B) zeigen die erwartete Steigerung der hepatischen Cyp2b10 Expression (ca. 2200-fach) in Nachkommen induzierter Weibchen.

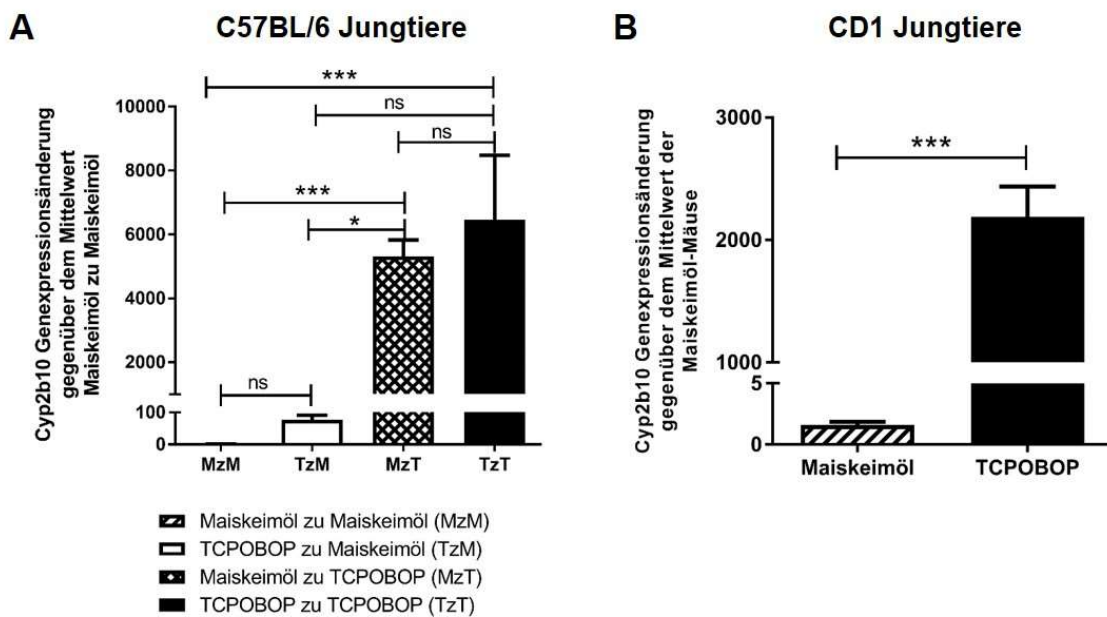


Abb. 22: Fremdpflege-Experiment zur Differenzierung zwischen prä- und postnataler Übertragung der Cyp2b10 Induktion

Fremdpflege von C57BL/6 Jungtieren nach Kaiserschnitt durch CD1 Ammen; C57BL/6 und CD1 Weibchen wurden mit TCPOBOP (3mg/kg) oder Maiskeimöl behandelt und eine Woche danach terminiert verpaart. Die Geburten der CD1 Mäuse erfolgten natürlich, die der C57BL/6 Mäuse an Tag 19,5 manuell per Kaiserschnitt. Die C57BL/6 Jungtiere wurden daraufhin einer CD1 Amme im Austausch zu einem Teil ihrer Jungtiere zur Fremdpflege untergeschoben. Neben dem Wechsel zwischen reziprok behandelten Müttern und Ammen erfolgten auch nicht-reziproke Kontrollen; die hepatische Cyp2b10-mRNA Expression wurde in den adoptierten C57BL/6 (A) und mitgesäugten CD1 (B) F₁ Mäusen im Alter von 6 Tagen mittels TaqMan® und $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode ermittelt. Dargestellt sind die Genexpressionsänderungen gegenüber (A) dem Mittelwert der Negativkontrolle (MzM; n=4-18) bzw. (B) dem Mittelwert der Nachkommen mit Maiskeimöl vorbehandelter CD1 Weibchen (n=22-25) (Mittelwert mit Standardfehler); statistisch signifikante Unterschiede wurden abhängig vom experimentellen Design nach einem

Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung mittels (A) Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-hoc Test bzw. (B) Mann-Whitney-Test ermittelt und mit Sternchen gekennzeichnet (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$)

3.3.4 Induzierbarkeit verschiedener CAR-Zielgene durch TCPOBOP

Chen et al. (2012) konnten eine dauerhafte Veränderung der Genexpression nach Applikation von TCPOBOP für nur 2 von 21 untersuchten CAR Zielgenen (Cyp2b10 und Cyp2c37) nachweisen. Auch die von Frau Dr. Marianne Mathäs im Rahmen ihrer Promotion (2014) durchgeführte Hochdurchsatzsequenzierung des Transkriptoms von F₀ Mäusen drei Tage bzw. drei Monate nach einer TCPOBOP-Injektion sowie von den sechs Tage bzw. drei Monate alten Nachkommen präkonzeptionell exponierter Weibchen detektierte neben Cyp2b10 kein anderes bekanntes CAR Zielgen mit signifikanten Veränderungen der Genexpression über alle Gruppen hinweg. Während diese Exklusivität der anhaltenden und generationsübergreifenden Aktivierung gut zu den vorgeschlagenen genspezifischen epigenetischen Veränderungen passt (Chen *et al.* 2012), wäre nach der postulierten Akkumulation von TCPOBOP im Fettgewebe (Poland *et al.* 1980, Smith *et al.* 1993) gefolgt von sukzessiver Freisetzung eine dauerhafte Aktivierung aller CAR Zielgene zu erwarten.

Anhand der Hochdurchsatzsequenzierung von Frau Dr. Mathäs, welche für diese Arbeit unter Verwendung des ‚Genomatix Genome Analyzer‘ (V3.40820) erneut ausgewertet wurde, bestätigt werden, dass die Zielgene von CAR bereits unmittelbar nach der Exposition unterschiedlich stark induziert werden. So ist die hepatische Cyp2b10 Expression in männlichen Mäusen, welche im Alter von drei Tagen mit TCPBOP (3 mg/kg) behandelt und drei Tage danach untersucht wurden 2400-fach induziert. Im Vergleich dazu ist die Expression von Cyp3a11 beispielsweise nur 6,4-fach erhöht, was Abweichungen in der Sensitivität der beiden Gene zeigt. Um die Unterschiede in der Sensitivität zu verdeutlichen, wurden adulte Mäuse mit verschiedenen TCPOBOP Konzentrationen behandelt, um drei Tage später die direkte Induktion einiger CAR-Zielgene zu vergleichen. Neben Cyp2b10 und Cyp3a11, welches nach drei Monaten keine Expressionserhöhung mehr zeigt, wurde auch Cyp2c29 analysiert, das in der Hochdurchsatzsequenzierung zunächst sogar stärker als Cyp2b10 induziert wird (2750-fach), nachfolgend aber keine anhaltende Expressionsänderung durchläuft.

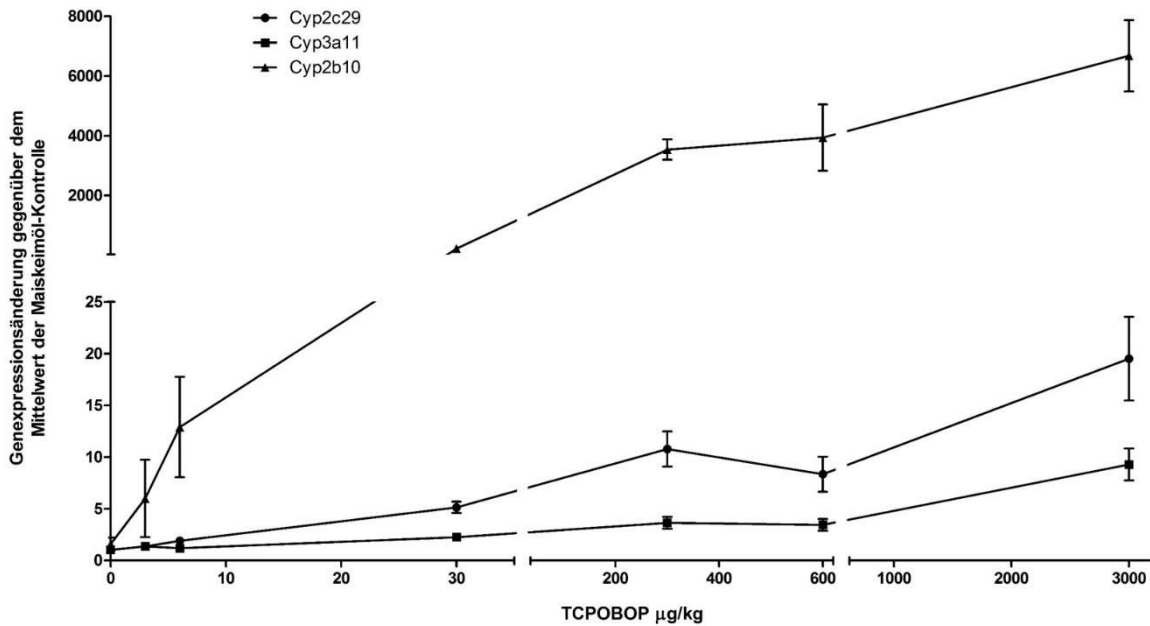


Abb. 23: Induktion von Cyp2b10, Cyp3a11 und Cyp2c29 durch verschiedene Dosen TCPOBOP

Hepatische Genexpressionsanalysen von acht Wochen alten männlichen Mäusen, die mit TCPOBOP (3 µg/kg, 6 µg/kg, 30 µg/kg, 300 µg/kg, 600 µg/kg oder 3000 µg/kg i.p. in Maiskeimöl) behandelt wurden. Die mRNA Expression wurde nach 3 Tagen mittels TaqMan® (Cyp2b10, Cyp3a11) bzw. SYBR-Green q RT PCR (Cyp2c29) und $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode ermittelt. Dargestellt sind die Genexpressionsänderungen von Cyp2b10 (Dreiecke), Cyp3a11 (Quadrate) und Cyp2c29 (Kreise) gegenüber dem Mittelwert der Lösungsmittelkontrolle (Mittelwert mit Standardfehler) in Abhängigkeit von der TCPOBOP Dosis (ähnlich einer Dosis-Wirkungskurve). Auf Grund der kleinen Gruppengröße (n=4) erfolgten keine statistischen Analysen.

Ähnlich einer Dosis-Wirkungskurve zeigt Abb. 23 die Induktionswerte der drei Cytochrome in Abhängigkeit von den applizierten Dosen (vgl. A3 Tab. A 3). Während die Expression von Cyp2b10 bereits bei den beiden niedrigsten Dosen (3 µg/kg bzw. 6 µg/kg) ansteigt (6-fach bzw. 13-fach), ist für Cyp3a11 und Cyp2c29 noch keine Induktion detektierbar. Erst ab 30 µg/kg ist auch eine langsame Erhöhung der Expression dieser Cyps nachweisbar. Mit weiter zunehmenden Konzentrationen steigt die Induktion aller drei Cytochrome, wobei die Expressionserhöhung von Cyp2b10 im Schnitt etwa 300-mal über der von Cyp2c29 bzw. circa 750-mal über der von Cyp3a11 liegt. Besonders deutlich wird der Sensitivitäts-Unterschied auch, wenn man den TCPOBOP-Bedarf zum Erreichen einer bestimmten Expressionssteigerung vergleicht. Während beispielsweise eine 10-fache Induktion von Cyp2b10 bereits nach der Applikation von 3-6 µg/kg messbar ist, bedarf es für einen vergleichbaren Effekt auf Cyp2c29 und Cyp3a11 etwa der 100-fachen bzw. 1000-fachen Dosis.

3.3.5 Direkter Nachweis von TCPOBOP in murinem Fettgewebe

Poland et al. (1980) konnten durch radioaktive Markierung drei Tage nach der Exposition von Mäusen gegenüber einer Dosis von 3 mg/kg die Akkumulation von etwa 20 µg TCPOBOP pro Gramm murinem Fettgewebe nachweisen. Das Ausmaß dieser Akkumulation wird besonders

deutlich bedenkt man, dass ausgehend vom durchschnittlichen Gewicht einer Maus (~25 g) insgesamt nur ca. 75 µg TCPOBOP appliziert wurden. Entsprechend dieser massiven Anreicherung sollte TCPOBOP nach einer Transmission durch direkte postkonzeptionelle Exposition auch im Fettgewebe der Tiere der F₁ Generation nachweisbar sein.

Dafür wurden - nach Extraktion des TCPOBOPs aus der für Messungen ungeeigneten Fettmatrix - HPLC-MS/MS Analysen von Dr. M. M. (Institut für Molekulare Biologie Mainz) durchgeführt. TCPOBOP wird unter den verwendeten HPLC Bedingungen nach 4,8 min. als scharfer und entsprechend deutlich zu erkennender Peak (vgl. Abb. 24A) detektiert, dessen Identität dank der markanten Isotopenverteilung von TCPOBOP in der Massenspektrometrie sicher validiert werden kann (vgl. Abb. 24B). Obwohl bislang keine wiederholten Analysen zur exakten Quantifizierung vorliegen, spiegelt die vergleichende Messung des TCPOBOP-Gehalts im Fett adulter F₀ Mäuse, denen drei Tage vor der Gewebeentnahme unterschiedliche Konzentrationen TCPOBOP gespritzt wurden (vgl. Abb. 24C), bereits jetzt sichtbar die graduelle Dosisreduktion des experimentellen Designs wider. Zuverlässige Nachweise für TCPOBOP scheinen dabei möglich, sobald Mengen von ca. 0,1 ng oder mehr extrahiert werden können. Dies umfasst in der F₀ Generationen drei Tage nach Exposition die 100-fache Verdünnung (30 µg/kg) der bei einmaliger Applikation in der Regel eingesetzten TCPOBOP-Konzentration (3 mg/kg). Der im Fett einer adulten F₀ Maus zwölf Wochen nach der Injektion (3 mg/kg) gemessene TCPOBOP-Gehalt liegt mit 0,8 ng knapp unter dem drei Tage nach einer Dosis von 0,3 mg/kg detektierten. Auch im Gewebe einer parallel untersuchten 12 Wochen alten F₁ Maus, deren Mutter eine Woche vor der Verpaarung mit TCPOBOP (3 mg/kg) behandelt wurde, ist TCPOBOP mit Massenspektrometrie eindeutig nachweisbar. Allerdings ist die in der HPLC ermittelte Menge mit 11 ng unerwartet hoch und liegt sogar über dem Wert der F₀ Maus, welcher erst drei Tage zuvor TCPOBOP (3 mg/kg) gespritzt wurde. In einem vorangegangenen Experiment, welches nicht absolut quantifiziert wurde, konnten - relativ betrachtet - für die F₁ Generation jedoch Mengen detektiert werden, die vergleichbar mit jenen sind, welche in F₀ Mäusen drei Tage nach Applikation einer Dosis von 0,03 mg/kg beobachtet wurden (vgl. A3 Abb. A 9). Entsprechend konnte zwar qualitativ bereits ein eindeutiger Nachweis erfolgen, doch eine Aussage zur Quantität von TCPOBOP im Fettgewebe von F₁ Mäusen sollte erst nach weiteren Messungen getroffen werden.

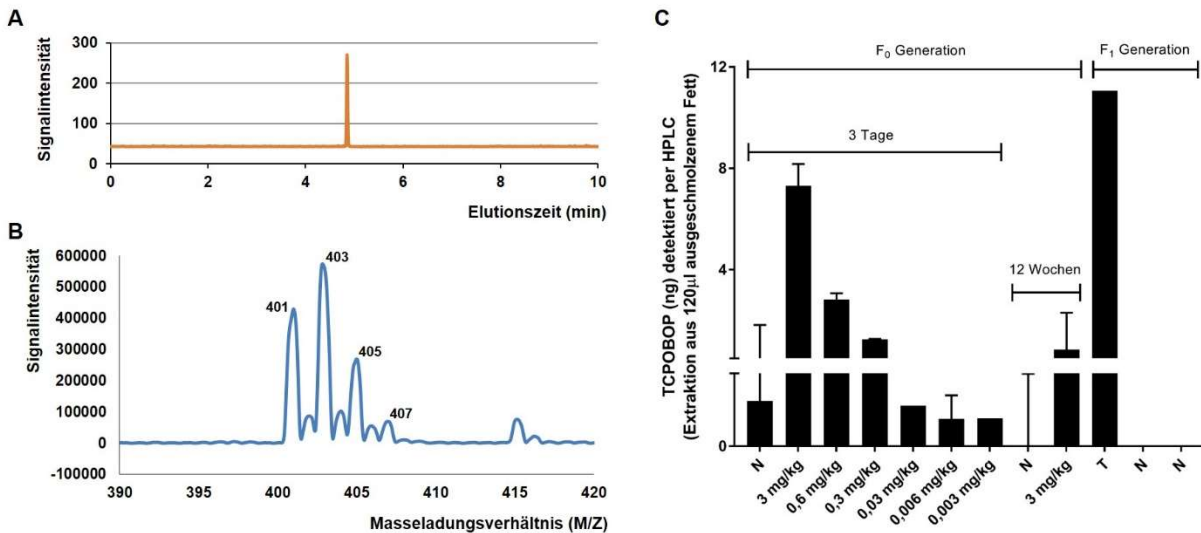


Abb. 24: Detektion von TCPOBOP in murinem Fettgewebe mittels HPLC-MS/MS

(A) HPLC Migration des aus dem Fettgewebe einer drei Tage zuvor exponierten (3 mg/kg) F₀ Maus extrahierten TCPOBOP in 50% ACN Wasser (B) Isotopen-Verteilung von TCPOBOP, gemessen per Massenspektrometrie ausgehend von purem TCPOBOP gelöst in 50% ACN/Wasser (C) Experiment zur Detektion und absoluten Quantifizierung von TCPOBOP in murinem Fettgewebe von (1.) acht Wochen alten männlichen Mäusen, die drei Tage zuvor mit TCPOBOP (3 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,006 mg/kg oder 0,003 mg/kg i.p. in Maiskeimöl) behandelt wurden (2.) männlichen Mäusen, die 12 Wochen zuvor im Alter von 6 Wochen mit TCPOBOP (3 mg/kg i.p. in Maiskeimöl) behandelt wurden (3.) 12 Wochen alten männlichen F₁ Mäusen, deren Mütter präkonzeptionell mit TCPOBOP (3 mg/kg i.p. in Maiskeimöl) behandelt wurden; dargestellt ist die absolute Menge TCPOBOP (ng), welche aus den 120 µl ausgeschmolzenem Fett extrahiert werden konnte (Mittelwert + Standardabweichung); die eingezeichnete Standardabweichung beruht auf der Messung verschiedener Verdünnungen der einzelnen Extrakte; N = Negativ- bzw. Lösungsmittelkontrolle, T = F₁ Tier von einer mit TCPOBOP vorbehandelten Mutter. Abbildung erstellt basierend auf Daten aus HPLC-MS-Analysen durchgeführt von M. M. (Institut für Molekulare Biologie [IMB] Mainz).

3.4 Erste Untersuchungen klinisch relevanter Induktoren

Der im Rahmen dieser Arbeit genutzte Modell-Aktivatoren von murinem CAR TCPOBOP ist humanmedizinisch zwar nicht relevant, die den beschriebenen Effekten zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch - mit kleinen Abweichungen - auch im menschlichen System von Bedeutung. Demnach sind nach Aktivierung von humanem CAR ebenfalls anhaltende Expressionsveränderungen sowie generationsübergreifende Prozesse vorstellbar, die - wie im Mausmodell beobachtet - weitreichende Konsequenzen haben könnten. Entsprechend sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit neben TCPOBOP auch einige häufig angewandte CAR aktivierende Medikamente getestet werden.

Da sie sowohl im humanen als auch im murinen System CAR-spezifisch ohne PXR-Beteiligung den Fremdstoffmetabolismus aktivieren (Jackson *et al.* 2006), wurden die antikonvulsiven Medikamente Phenobarbital und Phenytoin für einen ersten Versuch im Mausmodell ausgewählt und für ein möglichst realitätsnahes experimentelles Design über drei Wochen oral über das Trinkwasser (Phenobarbital 0,05 % w/v) oder das Futter (Phenytoin 500 ppm) appliziert. Während direkt nach Ende der Behandlung sowohl für Phenobarbital als auch

für Phenytoin eine deutliche Induktion von Cyp2b10 in der Leber messbar ist (vgl. Abb. 25A), die trotz der kleinen Versuchsgruppen (n=4) sogar Signifikanz erreicht, kann bereits 14 Tage danach keine Expressionserhöhung mehr detektiert werden (vgl. Abb. 25B). Auch die Nachkommen von weiblichen Tieren, die eine Woche nach Abschluss der oralen Applikation verpaart wurden, zeigen keine Veränderung der hepatischen Cyp2b10 Expression (vgl. Abb. 25C).

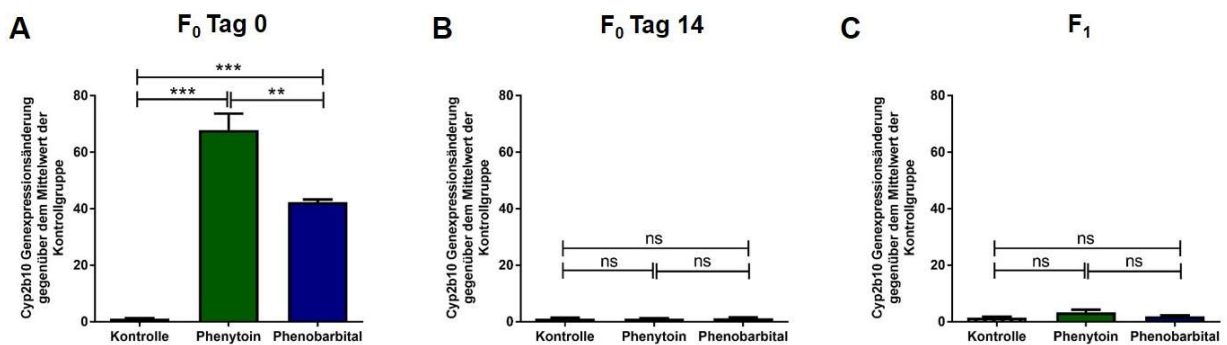


Abb. 25: Cyp2b10-Expression in der Leber mit Phenobarbital oder Phenytoin vorbehandelter Mäuse und ihrer Nachkommen

Analyse der hepatischen Cyp2b10-Expression von (A+B) adulten weiblichen F₀ Mäusen, die für drei Wochen ad libitum mit Phenobarbital-versetztem Trinkwasser (0,05 % w/v) oder Phenytoin-haltigem Futter (500 ppm) versorgt wurden unmittelbar (A) bzw. 14 Tage (B) nach der Behandlung sowie von (C) ihren 6 Tage alten Nachkommen, gezeugt bei einer Verpaarung eine Woche nach Abschluss der Applikation; die hepatische Cyp2b10 mRNA Expression wurde mittels TaqMan und $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode ermittelt. Dargestellt sind die Genexpressionsänderungen gegenüber dem Mittelwert der mit normalem Futter und Wasser versorgten Tiere der Kontrollgruppe (Mittelwert mit Standardfehler; F₀ n=4; F₁ n=9-17). Statistisch signifikante Unterschiede wurden abhängig vom Ergebnis eines Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung mittels einfaktorierter Varianzanalyse und Bonferroni Korrektur (A + B) bzw. Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-hoc Test (C) ermittelt und mit Sternchen gekennzeichnet (**, p<0,01; ***, p<0,001).

In einem parallel durchgeführten Experiment nach intraperitonealer Applikation des Antiepileptikums Carbamazepin, welches ebenfalls CAR-spezifisch ist (Park *et al.* 2012), ist die nach vier Stunden deutlich messbare Induktion von Cyp2b10 sogar bereits nach 24 Stunden nicht mehr detektierbar (vgl. A3 Abb. A 10).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die generationsübergreifenden Effekte nach CAR-Aktivierung durch den Modellliganden TCPOBOP in Mäusen untersucht, wobei neben dem Fremdstoffmetabolismus auch Konsequenzen in endogenen Stoffwechselwegen analysiert wurden. Darüber hinaus wurden der zugrunde liegende Übertragungsmechanismus identifiziert und einige humane Medikamente auf ihr Potential derartige Nebenwirkungen hervorzurufen untersucht. Im Folgenden sollen die beobachteten multigenerationalen Effekte der CAR-Aktivierung sowie ihre humanmedizinische Relevanz diskutiert werden. Gleichzeitig soll - basierend auf dem Mechanismus und anhand individueller Stoffeigenschaften - eine Abschätzung des Risikopotentials verschiedener Medikamente und Fremdstoffe erfolgen und auf die biologische Funktion der Transmissionsprozesse eingegangen werden.

4.1 Nachhaltige und generationsübergreifende Beeinflussung der Kapazität des Fremdstoffmetabolismus nach CAR-Aktivierung

Bereits die anhaltenden und generationsübergreifenden Expressionsänderungen von Cyp2b10, welche auf mRNA- und Proteinebene detektiert wurden, legen die Beeinflussung des hepatischen Fremdstoffmetabolismus exponierter Tiere und ihrer Nachkommen nahe. Entsprechende Unterschiede in der individuellen metabolischen Kapazität von Tieren beider Generationen konnten im Rahmen dieser Arbeit anhand von medikamentös induzierter Paralyse durch Applikation des Muskelrelaxanziums Zoxazolamin (Chen *et al.* 2012, Willson und Kliewer 2002, Zhang *et al.* 2004) nachgewiesen werden (vgl. 3.2.1). Die deutliche Verkürzung der Paralyse nach TCPOBOP-Exposition ist ein eindeutiger Hinweis auf einen Anstieg der Stoffwechselrate der Zoxazolamin metabolisierenden Cyp-Enzyme.

Dabei gilt es zu berücksichtigen, dass Zoxazolamin nicht nur durch Cyp2b (Willson und Kliewer 2002), sondern auch durch diverse andere Cyp-Enzyme umgesetzt wird (Dong *et al.* 2009a). Da jedoch Analysen in Knockout-Stämmen eindeutig belegen, dass CAR-vermittelte Effekte entscheidend für den Paralysechutz sind (Honkakoski *et al.* 2003, Swales und Negishi 2004, Zhang *et al.* 2004) und sowohl in den Versuchen von Chen *et al.* (2012) als auch in der Hochdurchsatzsequenzierung von Frau Dr. Mathäs kein anderes bekanntes CAR-Zielgen nachhaltige und multigenerationale Veränderungen der Genexpression zeigte, kann die Paralysezeit mit der Cyp2b-Aktivität korreliert werden.

Vergleichbare Effekte - ausgelöst durch die präkonzeptionelle Einnahme von Medikamenten oder den Kontakt zu anderen Fremdstoffen - wären im Menschen medizinisch hoch-relevant, da sie zu erheblichen Abweichungen in der Pharmakotherapie und entsprechenden

gesundheitlichen Problemen von Mutter und Kind führen könnten. So würden eingenommene Wirkstoffe bei normaler Dosierung auf Grund der massiven Erhöhung der metabolischen Kapazität in sub-therapeutischen Plasmakonzentrationen vorliegen, was zum Wirkverlust führen würde. Eine Expressionsveränderung der humanen CYP2B-Isoform CYP2B6 – der orthologen Isoform des murinen Cyp2b10 (Hedrich *et al.* 2016) - beispielsweise würde die Therapie zahlreicher Erkrankungen beeinflussen, da CYP2B6, welches circa 3% bis 6% der hepatischen CYPs ausmacht, am Metabolismus von 2% bis 10% aller klinisch genutzten Medikamente beteiligt ist (Hedrich *et al.* 2016, Turpeinen und Zanger 2012). Es verstoffwechselt unter anderem die Analgetika Methadon, Tramadol und Diclofenac, die Anästhetika Propofol, Ketamin und Lidocain, die antiretroviralen Medikamente Efavirenz und Nevirapin sowie das Antidepressivum Bupropion und aktiviert die Chemotherapeutika Cyclophosphamid und Ifosphamid (Turpeinen und Zanger 2012, Zanger und Klein 2013).

Neben den Konsequenzen im zentral von CAR gesteuerten Fremdstoffmetabolismus wurden auch endogene Stoffwechselwege auf Veränderungen untersucht, da man zwischenzeitlich davon ausgeht, dass CAR auch ein wichtiger endogener Regulator ist (Hernandez *et al.* 2009).

4.2 CAR-Aktivierung durch TCPOBOP führt zu osteoanabolen-Effekten

In männlichen CAR-Knockout Mäusen konnte eine erhöhte Knochenmineraldichte (BMD) nachgewiesen werden (Cho *et al.* 2014), die auf die erniedrigte hepatische Basalexpression der testosteron-metabolisierenden CAR-Zielgene Cyp2b9 und Cyp2b10 (Guo *et al.* 2007, Notelovitz 2002, Vico und Vanacker 2010) und die entsprechend erhöhte Serumkonzentration des osteoanabolen Sexualhormons zurückzuführen sein könnte. Ausgehend von diesen Beobachtungen könnte die anhaltende Induktion von Cyp2b10 nach TCPOBOP Exposition einen Anstieg im Testosteronmetabolismus und eine Reduktion der BMD hervorrufen.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen des Knochenmetabolismus (vgl. 3.2.2) zwölf Wochen nach TCPOBOP Exposition (3mg/kg) deuten jedoch eher auf knochenanabole Prozesse hin. So weist insbesondere der trabekuläre Knochenbereich im Mikro-CT signifikante Zunahmen im Knochen-Volumen-Anteil und der trabekulären Dicke auf. Trotzdem die Mineraldichte noch nicht signifikant verändert ist, scheint sie zu steigen. Da der kortikale Knochen allgemein metabolisch weniger aktiv ist (Clarke 2008), sind die Veränderungen in diesem Knochenkompartiment nicht so weitreichend, allerdings konnten auch hier Trends zur Steigerung der kortikalen Dicke und zur Zunahme von Knochen- und Gesamtvolumen festgestellt werden. Die detektierte Reduktion der gewebspezifischen Mineraldichte im kortikalen Knochen scheint zunächst gegen Knochenbildung zu sprechen, kann jedoch auch auf schlecht mineralisierten Faserknochen zurückgehen, der bei schneller

Produktion des Osteoids (organische Knochenmatrix) während des Wachstums, nach Verletzungen oder durch anabole Stimuli geformt wird (Fazzalari 2011, Hernandez *et al.* 2004, Weiske *et al.* 1998).

Der nötige Umbau des Faserknochens in stabilen Lamellenknochen, der ausreichend mit Hydroxylapatit mineralisiert ist, könnte auch den Anstieg des Knochenabbaumarkers CTX-1 im Serum TCPOBOP vorbehandelter Mäuse erklären. Entgegen der Hypothese, aber passend zu den Ergebnissen der Mikro-CT-Messungen, wurden in den ELISAs darüber hinaus tendenziell erhöhte Serumkonzentrationen von Testosteron und den Markern für knochenbildende Osteoblastenaktivität P1NP und Osteocalcin gemessen. Die parallel untersuchten wöchentlich mit einer kleineren Dosis TCPOBOP behandelten Mäuse zeigen tendenziell vergleichbare Effekte - allerdings in geringerer Ausprägung. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die anabolen Prozesse auf Grund der geringeren Einzeldosis erst nach Akkumulation einiger Dosen und somit später eingesetzt haben und entsprechend noch nicht so weit fortgeschritten sind. Eine Analyse einige Wochen später hätte somit möglicherweise identische Ergebnisse geliefert.

Die Knochen der Tiere der F₁ Generation weisen zwar eine Reduktion des Gesamtvolumens auf, da jedoch kortikale und trabekuläre Dicke unverändert sind, der mittlere Abstand zwischen den Trabekeln sogar abnimmt und Knochen-Volumen-Anteil (BV/TV) sowie Knochenmineraldichte tendenziell sogar steigen, scheint der Rückgang der Knochenmasse rein quantitativ. Ein osteoporotischer qualitativer Verlust von Knochenmasse, welcher die Stabilität beeinflusst und das Frakturrisiko erhöht, zeichnet sich durch einen deutlichen Rückgang des Knochenmineralsalzgehalts und den Verlust von Mikrostrukturen aus (Drake und Khosla 2012, Weiske *et al.* 1998) und liegt somit nicht vor. Auch die Serumanalysen der F₁ Generation geben keinerlei Hinweise auf katabole Prozesse, die den Masseverlust erklären könnten, da der Marker für Resorption CTX-1 keine Veränderung zeigt, wohingegen Osteocalcin, welches als Osteoidbestandteil beim Knochenaufbau von Osteoblasten produziert wird, sogar signifikant erhöht ist. Für Osteocalcin ist darüber hinaus bereits im Vergleich zu den fünf Wochen älteren F₀ Mäusen die physiologische Reduktion des Serumspiegels mit zunehmendem Alter zu erkennen (Gundberg *et al.* 1992, Kondo *et al.* 2015).

Da die für die beschriebenen Analysen verwendeten Mäuse vor der Entblutung nicht gefastet hatten, CTX-1 jedoch empfindlich gegenüber dem Insulinstatus und dem zirkadianen Rhythmus ist (Lee und Vasikaran 2012, Schlemmer und Hassager 1999), wurden die Messungen mit dem Serum von Mäusen wiederholt, die vor der Herzpunktion über Nacht gefastet hatten (vgl. Abb. A 11). Neben der Analyse der F₁ Generation und anhaltender Veränderungen in exponierten F₀ Tieren zwölf Wochen nach TCPOBOP-Applikation (3 mg/kg)

sollten im Rahmen dieser Wiederholung auch schnell einsetzende Effekte durch Untersuchung nach einer Woche erfasst werden. Die CTX-1-Werte dieser zweiten Untersuchung sind - wie nach dem Fasten zu erwarten - über alle Gruppen hinweg erhöht (Schlemmer und Hassager 1999), bestätigen aber das Resultat der ersten Messung der F₁ Generation. Der zuvor in der F₀ Generation detektierte Anstieg der Serumkonzentration war in diesem Experiment jedoch nicht nachweisbar. Entgegen den Erwartungen wurden im Rahmen der Wiederholung auch für P1NP und Osteocalcin, welche eigentlich kaum durch den Zirkadianrhythmus oder kürzliche Nahrungsaufnahme beeinflusst werden sollten (Lee und Vasikaran 2012, Schlemmer und Hassager 1999), veränderte Resultate ermittelt. Im Widerspruch zu den im Knochen detektierten anabolen Veränderungen sind beide Marker für Knochenbildung in der zweiten Messung reduziert, was katabole Prozesse nahelegen würde. Möglicherweise ist die Reduktion der Marker für Knochenbildung in den exponierten Tieren und ihren Nachkommen darauf zurückzuführen, dass die für Mäuse unphysiologisch lange Fastenzeit (16 h) während der Nacht, in der normalerweise am meisten Nahrung aufgenommen wird, einen katabolen Status hervorruft (Ayala *et al.* 2010). Dieser metabolische Stress könnte in den TCPOBOP Tieren durch die Induktion des Fremdstoffmetabolismus, welche sehr viel Energie benötigt, weiter verstärkt werden und so zu einer Einschränkung anderer energieaufwendiger Prozesse wie Knochenbildung führen. Auf die Wiederholung der Testosteron-Messungen wurde verzichtet, da kein kommerziell verfügbarer ELISA auf Grund der Kreuzreaktivität der Antikörper eine sichere Differenzierung zwischen Testosteron und dem durch Cyp2b9 und Cyp2b10 produzierten Metaboliten 16 α -Hydroxytestosteron (Guo *et al.* 2007) ermöglicht.

Zusammenfassend widersprechen die in der F₀ Generation beobachteten anabolen Effekte nicht nur der ursprünglichen katabolen Hypothese, sondern auch der in Ratten und Mäusen beobachteten BMD-Reduktion nach fünfwöchiger Behandlung mit Phenytoin (Anwar *et al.* 2014a, Anwar *et al.* 2014b, Onodera *et al.* 2001) und den knochenschädigenden Nebenwirkungen chronischer Behandlungen mit CAR-aktivierenden Medikamenten wie den Anticonvulsiva Phenobarbital, Carbamazepin oder Phenytoin (Lee *et al.* 2010, Meier und Kraenzlin 2011, Pack und Morrell 2004). Sie passen jedoch zu den osteo- und chondroprotektiven Effekten von PXR, deren Ursache allerdings bislang unklar ist (Azuma *et al.* 2010, Azuma *et al.* 2015). Trotzdem außer der Steigerung von Serumosteocalcin in der F₁ Generation kein generationsübergreifender Effekt auf die Knochenhomöostase nachgewiesen werden konnte, ist die beobachtete osteoanabole Wirkung von medizinisch großem Interesse, da die hohe Inzidenz von Osteoporose sehr eingeschränkten pharmakologischen Behandlungsmöglichkeiten gegenüber steht. So erkrankten etwa 50% der Frauen und ca. 20% der Männer im Alter von 50 Jahren im Verlauf ihres restlichen Lebens an Osteoporose (Cummings und Melton 2002). Das Therapiespektrum beschränkt sich bislang jedoch neben der Zufuhr von Vitamin D und Calcium im Wesentlichen auf die anti-resorptiv wirkenden

Bisphosphonate, welche gegebenenfalls durch den monoklonalen Antikörper Denosumab ergänzt werden können (Gupta und March 2016). Während Bisphosphonate toxisch auf die knochenabbauenden Osteoclasten wirken (Soares *et al.* 2016), verhindert Denosumab schon die Reifung der Osteoclasten durch Hemmung der Interaktion zwischen RANK (Receptor Activator of NF- κ B) und seinem Liganden (RANKL) (Hanley *et al.* 2012). Alternativ stehen noch der Östrogen-Rezeptor-Modulator Raloxifen, welcher jedoch ausgehend von bisherigen Studien nur das vertebrale und nicht das periphere Frakturrisiko senkt (DVO-Leitlinie Osteoporose), sowie Strontium-Ranelat, dessen Einsatz auf Grund seines kardiovaskulären Risikopotentials eingeschränkt wurde (EMA/235924/2014, Fachinfo Strontiumranelat, Rote Hand Brief), zur Verfügung. Bei massiver Ausprägung der Osteoporose darf darüber hinaus der anabole, die Bildung und Aktivität der knochenbildenden Osteoblasten anregende Wirkstoff Teriparatid eingenommen werden. Die Behandlung mit Teriparatid ist allerdings auf maximal 24 Monate beschränkt, da in Tierstudien bei längerer Einnahme Osteosarcome aufgetreten sind (Fachinformation Teriparatid). Um festzustellen, ob die Aktivierung von CAR oder PXR langfristig einen geeigneten Therapieansatz bieten könnte, muss jedoch zunächst der den beobachteten anabolen Effekten zugrundeliegende Mechanismus aufgeklärt werden.

Eine mögliche Erklärung für die osteoanabole Wirkung wäre eine direkte Beeinflussung des Knochens durch TCPOBOP, die die bislang postulierten systemischen Effekte im Steroidhormonhaushalt überlagert. Da Osteoblasten und Osteoklasten ebenfalls CAR exprimieren (Cho *et al.* 2014), ist es durchaus vorstellbar, dass ein hoch-affiner Agonist wie TCPOBOP (Moore *et al.* 2002, Moore *et al.* 2000, Suino *et al.* 2004) auch in diesen Zellen durch Bindung an CAR Veränderungen hervorruft. Bedenkt man darüber hinaus die in den Osteoblasten von Ratten beobachtete Expressionserhöhung von Osteocalcin nach der Bindung von Vitamin D an VDR (Lian *et al.* 1989, Uchida *et al.* 1994) sowie die enge phylogenetische Verwandtschaft von CAR und VDR (di Masi *et al.* 2009) ist es vorstellbar, dass beide Rezeptoren den Promotor von Osteocalcin binden. Eine derartige Bindung von CAR und PXR an eine VDR Erkennungssequenz konnte bereits am Promotor von CYP24 gezeigt werden (Moreau *et al.* 2007, Pascussi *et al.* 2008). Umgekehrt wiederum wurde die Bindung von VDR an die CAR bzw. PXR Zielgene CYP2B6, CYP2C9 und CYP3A4 nachgewiesen (Pascussi *et al.* 2008). Auch nukleäre Rezeptoren verschiedener Familien teilen Zielgene und Erkennungssequenzen. So wurde beispielsweise die Bindung von CAR und PXR an Thyroidhormonrezeptor-Erkennungssequenzen (TRE) sowie die von TR (Thyroidhormonrezeptor) und LXR (Leber-X-Rezeptor) an CYP2B, CYP2C und CYP3A (Handschin und Meyer 2003, Pascussi *et al.* 2008) beobachtet. Zwar scheint Vitamin D in der Maus die Expression von Osteocalcin zu senken (van Driel und van Leeuwen 2014), doch es konnte eine Erhöhung nach Bindung des Thyroidhormonrezeptors gezeigt werden (Siddiqi *et al.* 2002, Varga *et al.* 2003). Osteocalcin ist als Bestandteil der extrazellulären Matrix

unmittelbar knochenbildend, wirkt aber auch systemisch als Hormon. In dieser Funktion stimuliert es unter anderem die Testosteron-Synthese in den Leydigzellen der Hoden (Brown *et al.* 1984, Karsenty und Ferron 2012, Oldknow *et al.* 2015). Somit könnte eine CAR-vermittelte Induktion der Osteocalcin-Expression nicht nur die erhöhten Serumkonzentrationen von Osteocalcin selbst, sondern auch die von Testosteron sowie die mittels Mikro-CT ermittelten anabole Effekte im Knochen erklären. Ob es tatsächlich zu einer Induktion durch direkte Bindung von CAR an den Osteocalcin-Promotor in Osteoblasten kommt, könnte durch ein Reporter-gen-Assay aufgeklärt werden. Vergleichbare Analysen zur Bindung von VDR und TR wurden bereits erfolgreich in MC 3T3 E1 Präosteoblasten durchgeführt (Lian *et al.* 1997, Varga *et al.* 2003).

Sollten die Reporter-gen-Versuche keine Induktion durch Bindung von CAR zeigen, könnte die Erhöhung der Osteocalcin-Expression alternativ auch auf die Inhibition der FoxO1-Aktivität zurückgehen, die nach CAR-Aktivierung auf Grund von Squelching-Effekten bereits in Hepatozyten gezeigt werden konnte (vgl. 1.4, (Kobayashi *et al.* 2015)). FoxO1 wiederum inhibiert in Osteoblasten die Expression von Osteocalcin und fördert darüber hinaus die Expression von Esp (‘embryonic stem cell phosphatase’). Esp katalysiert die Carboxylierung von Osteocalcin, was die Affinität zu Hydroxylapatit erhöht, es somit im Osteoid bindet und die hormonelle Aktivität herabsetzt (Rached *et al.* 2010). Eine Absenkung der FoxO1 Aktivität in den Osteoblasten durch CAR-Aktivierung würde somit nicht nur zur erhöhten Expression von Osteocalcin, sondern auch zur vermehrten Freisetzung der unterkarboxylierten hormonell aktiven Form führen. Da Serumosteocalcin unter anderem auch die β -Zell-Proliferation und Insulinsekretion im Pankreas stimuliert (Karsenty und Ferron 2012, Patti *et al.* 2013), kann die FoxO1 Aktivität durch den Insulin-vermittelten Kern-Export weiter herabgesetzt werden (vgl. 1.4) (Kodama *et al.* 2004). Fehlende FoxO1-Aktivität im Knochen wiederum führt im Knockout-Modell ebenfalls zu erhöhter Insulinsekretion der Bauchspeicheldrüse (Rached *et al.* 2010), so dass die anabolen Effekte über Osteocalcin durch Insulin sogar verstärkt werden könnten.

Neben den bereits beschriebenen stimulierenden Wirkungen auf Testosteron und Insulin-Produktion fördert Osteocalcin auch die Insulinsensitivität in Fettgewebe, Muskeln und Leber und steigert den muskulären Energieverbrauch (Karsenty und Ferron 2012), weshalb es als wichtigster Mediator zwischen dem Knochenstoffwechsel und dem restlichen Organismus angesehen wird (Oldknow *et al.* 2015). Die besonders enge Verbindung der Knochenhomöostase zum Energiemetabolismus spiegelt sich auch in der verminderten BMD von Patienten mit Anorexia Nervosa (Legroux-Gerot *et al.* 2005) und im erhöhten Osteoporose-Risiko von Typ-2-Diabetikern (Leidig-Bruckner und Ziegler 2001, Oldknow *et al.* 2015, Yan *et al.* 2015) wider.

4.3 Generationsübergreifende positive Effekte auf Körpergewicht, Glukosetoleranz und Serumcholesterin nach CAR-Aktivierung

Für Mäuse sind bereits zahlreiche Interferenzen der CAR-vermittelten Detoxifizierung und des Energiestoffwechsels beschrieben (vgl. 1.4). So schützt beispielsweise die Induktion durch TCPOBOP unter hochkalorischer Ernährung vor Übergewicht (Gao *et al.* 2009, Mo und He 2014), was sich bei Applikation während der Schwangerschaft auch auf die direkten Nachkommen überträgt (Masuyama und Hiramatsu 2012). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der TCPOBOP-vermittelte Schutz vor Gewichtszunahme unter hochkalorischer Diät sowohl in unmittelbar vor der Futterumstellung exponierten F_0 Mäusen als auch in hochkalorisch ernährten Nachkommen präkonzeptionell vorbehandelter Weibchen untersucht.

Während in männlichen F_0 Mäusen der in der Literatur beschriebene protektive Effekt deutlich gezeigt werden konnte (vgl. 3.2.3) und sogar die mit Standarddiät gefütterten induzierten Tiere signifikant weniger wogen als die Lösungsmittelkontrollen, musste der Versuch mit weiblichen F_0 Tieren abgebrochen werden, da die Tiere die Futteraufnahme verweigerten. Die Ablehnung der Futterumstellung, welche hauptsächlich in den TCPOBOP Gruppen auftrat, scheint nach Rücksprache mit den Veterinärmedizinern des TARC eine Reaktion auf physischen Stress - ausgelöst durch die nach TCPOBOP Applikation zu beobachtende ausgeprägte Hepatomegalie - zu sein, welche auf die CAR-vermittelte Anregung der Proliferation von Hepatozyten und endoplasmatischem Retikulum zur Bereitstellung ausreichend vieler Cyps zurückgeht (Molnar *et al.* 2013). Bedenkt man, dass bereits 72h nach Exposition das Verhältnis des Leber- zum Körpergewichts von normalerweise etwa 4-5% bei erwachsenen Mäusen auf ca. 8-10% steigt (Blanco-Bose *et al.* 2008, Lin *et al.* 2011), wird klar welcher massiver metabolischer Stress mit dieser Veränderung einhergeht. Während die männlichen Tiere den durch die Futterverweigerung initial zu beobachtenden Gewichtsverlust auf Grund ihres insgesamt höheren Körpergewichts kompensieren konnten, zeigten die leichteren Weibchen sehr schnell Anzeichen von Unterernährung, was den physischen Stress weiter verstärkte und so in der absoluten Futterverweigerung gipfelte. Da die Hepatomegalie bereits nach wenigen Tagen wieder zurückgeht (Lin *et al.* 2011), wäre es im Nachhinein betrachtet besser, die Futterumstellung ein bis zwei Wochen nach der Injektion von TCPOBOP vorzunehmen.

In der F_1 Generation hingegen verlief die Futterumstellung problemlos, da die Tiere keinem zusätzlichen physischen Stress ausgesetzt waren. Allerdings waren weder männliche noch weibliche Tiere vor Gewichtszunahme durch hochkalorische Ernährung geschützt. Die normalkalorisch ernährten Nachkommen präkonzeptionell mit TCPOBOP behandelte Mütter waren jedoch signifikant leichter als die der Lösungsmittelkontrolltiere. Ausgehend vom ermittelten Transmissionsmechanismus durch die Muttermilch kann man dosisabhängige Effekte annehmen und davon ausgehen, dass die an die F_1 Tiere übertragene Menge

TCPOBOP deutlich geringer ist, als die der F_0 Generation applizierte Dosis. Bei hochkalorischer Ernährung und steigender Körperfettmasse könnte die kleinere Menge TCPOBOP möglicherweise so stark im Fettgewebe gebunden und verteilt werden, dass sie keinen ausreichenden systemischen Effekt mehr bewirken kann. Durch die mehr als ausreichende Kalorienzufuhr muss darüber hinaus zur Abdeckung des Energiebedarfs kein Fett und somit auch kein darin gebundenes TCPOBOP mobilisiert werden. Unter Standarddiät hingegen verbleibt der Körperfettanteil deutlich geringer; das vorhandene TCPOBOP wird weniger stark verteilt und bei Energiebedarf durch die Mobilisierung von vorhandenen Fettdepots wieder freigesetzt, wodurch es noch wirken kann.

Die Analyse des relativen Futtermittelsverbrauchs belegte, dass die durch TCPOBOP vermittelten protektiven Effekte nicht auf einer appetitzügelnden Wirkung basieren. Somit müssen sie auf Veränderungen des Stoffwechsels zurückgehen. Eine mögliche Ursache dafür könnte der im Zusammenhang mit den Untersuchungen zum Knochenmetabolismus gemessene Anstieg von hormonell aktivem Serum-Osteocalcin sein (vgl. 3.2.2), da dieses unter anderem auch die Insulinsensitivität der Muskeln und den muskulären Energieverbrauch steigert (Karsenty und Ferron 2012). In der Literatur werden die Veränderungen des Energiestoffwechsels nach CAR-Aktivierung im Allgemeinen jedoch auf Beeinflussungen des hepatischen Glukose- und Fettstoffwechsels zurückgeführt.

Kurz nach TCPOBOP-Applikation konnten in der Vergangenheit bereits reduzierte Blutglukose, verbesserte Glukosetoleranz und Insulinsensitivität sowie der Rückgang von Total-, LDL- und HDL-Cholesterin nachgewiesen werden (vgl. 1.4) (Dong *et al.* 2009b, Gao *et al.* 2009, Masson *et al.* 2008, Rezen *et al.* 2009), was im Rahmen der vorliegenden Arbeit für Blutglukose und Serum-Cholesterine eine Woche nach Exposition bestätigt werden konnte. Bereits acht Wochen später war jedoch keine Reduktion der basalen Blutglukose mehr messbar, wobei nach hochkalorischer Ernährung noch ein Trend zu erkennen war. Die parallel untersuchte Glukosetoleranz zeigte ebenfalls Verbesserungen, doch auch diese erreichten keine Signifikanz. Es ist jedoch durchaus vorstellbar, dass eine Verlängerung des mit neun Wochen eher kurz gewählten Diät-Zeitraums (Heydemann 2016), welche nicht durchgeführt wurde, um die Belastung für die Tiere möglichst gering zu halten, den Effekt verstärken würde.

Die in Kooperation mit Prof. B. gemessenen Serumcholesterine hingegen waren diätunabhängig auch anhaltend reduziert. Obwohl auf Grund der teils sehr kleinen Gruppengrößen keine statistische Auswertung erfolgen konnte (vgl. 3.2.3), erschien auch VLDL nach TCPOBOP-Exposition tendenziell reduziert, was in den Messungen eine Woche nach der Applikation nicht beobachtet werden konnte. Dies könnte auf einen sekundären Effekt hindeuten. Vergleicht man jedoch die absolut gemessenen Konzentrationen der normalkalorisch ernährten Tiere neun Wochen nach TCPOBOP mit den Messungen nach

einer Woche fällt auf, dass LDL- und VLDL-Cholesterin nach einer Woche deutlich erhöht sind, während HDL- und Total-Cholesterin identische Konzentrationsbereiche zeigen. Einen ähnlichen Effekt konnte L. G. im Rahmen ihrer Bachelorarbeit auch für Triacylglyceride beobachten. Ausgehend von der Literatur sind Triacylglyceridwerte von etwa 100 mg/dL in Mäusen zu erwarten (Amar *et al.* 2015, Powell *et al.* 2015). Eine Woche nach Injektion von TCPOBOP detektierte Frau G. jedoch, sowohl in den mit TCPOBOP behandelten Tieren als auch in den Lösungsmittelkontrollen, Werte im Bereich von 200-320 mg/dL. Durch Vergleichsanalysen mit komplett unbehandelten Mäusen gleichen Alters und Geschlechts konnte der Effekt auf das als Lösungsmittel verwendete Maiskeimöl, welches aus Triacylglyceriden besteht, zurückgeführt werden. Bedenkt man, dass VLDL die primäre Verpackungseinheit für Fette zum Transport durch den Körper ist und dass LDL der Überrest des VLDLs nach Abspaltung und Verteilung der Fettsäuren ist (Voet *et al.* 2002), erscheint der Anstieg beider Cholesterine als Folge einer Erhöhung der Triacylglyceride logisch. Ausgehend von der physiologisch sehr niedrigen VLDL-Konzentration in Mäusen (ca. 1 mg/dL; vgl. Abb. 18E+I), welche mit Standardverfahren nicht einmal messbar ist, könnte der durch das Maiskeimöl ausgelöste deutliche Anstieg der Serumkonzentration möglicherweise den TCPOBOP-Effekt überlagern.

Obwohl der Basalglukosespiegel der Nachkommen exponierter Weibchen keinen Unterschied zu denen der Lösungsmittelkontrollen zeigte, war anhand des signifikant schnelleren Glukoseabbaus in hochkalorisch ernährten F₁ Männchen ein TCPOBOP-vermittelter generationsübergreifender Effekt zu erkennen. Auch die weiblichen Nachkommen zeigten einen Trend zur Verbesserung der Glukosetoleranz, welcher jedoch im Rahmen des gewählten Diätzeitraums keine Signifikanz erreichte, da weibliche Mäuse im gebärfähigen Alter analog zu humanmedizinischen Beobachtungen besser vor metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen in Folge von Übergewicht geschützt sind (Griffin *et al.* 2016). Auch die in der F₀ Generation beobachtete Reduktion der Serumcholesterine nach TCPOBOP-Exposition wurde in die Nachkommen übertragen und ist in diesen geschlechts- und diätunabhängig als deutlicher Trend zu erkennen, welcher, da die gemessenen Unterschiede im Mittel nach hochkalorischer Ernährung größer sind, für die mit HFD gefütterten Tiere für Gesamtcholesterin und HDL sogar Signifikanz erreicht. Unter Standarddiät hingegen ist einzig die Abnahme von LDL in weiblichen Nachkommen auf Grund der geringen interindividuellen Variabilität der Mäuse innerhalb der Behandlungsgruppen signifikant.

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt (vg. 1.4), werden die CAR-vermittelten Effekte auf den Glukosehaushalt im allgemeinen auf eine Hemmung der Gluconeogenese (Mo und He 2014), vermittelt durch die verminderte Expression der Schlüsselenzyme Glukose-6-phosphatase (G6P) und Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK), zurückgeführt (Dong *et al.* 2009b,

Lynch *et al.* 2014). So konnten Miao *et al.* (2006) 24 h nach Injektion einer TCPOBOP-Dosis von nur 0,3 mg/kg eine um fast 50% verminderte Expression von G6Pc beobachten und Rezen *et al.* (2009) sahen 24 h nach TCPOBOP-Exposition (3 mg/kg) einen deutlichen Rückgang der Pck1-mRNA. Einen vergleichbaren Rückgang der Pck1-Expression konnten Ueda *et al.* (2002) bereits 12 h nach Applikation von Phenobarbital (100 mg/kg) nachweisen. Auch im Fettstoffwechsel wurden bereits einige Proteine identifiziert, deren Expression durch Aktivierung von CAR reprimiert wird (Loscher *et al.* 1993, Mo und He 2014, Wada *et al.* 2009). Zum Beispiel wurden signifikante Abnahmen der Expression des nukleären Rezeptors Ppara (Maglich *et al.* 2009, Rezen *et al.* 2009), des Transkriptionsfaktors Srebf1 (Zhai *et al.* 2010) und des Apolipoproteins von HDL (Apoa1) (Masson *et al.* 2008) kurz nach TCPOBOP-Exposition beschrieben.

Die transkriptionelle Inhibition all dieser Gene wiederum geht zurück auf ‚Squelching Effekte‘ zwischen CAR und den die Glukoneogenese und den Fettstoffwechsel regulierenden Transkriptionsfaktoren HNF4 α , FoxO1, LXR und FXR (Gao und Xie 2010, Kobayashi *et al.* 2015, Miao *et al.* 2006). So konkurrieren beispielsweise CAR und der die Promotorregion von G6Pc und Pck1 bindende nukleäre Rezeptor HNF4 α nicht nur um dieselben Erkennungssequenzen auf der DNA, sondern auch um Cofaktoren (SRC2/GRIP1 und PGC1) (Kobayashi *et al.* 2015). Die von CAR gebundenen Cofaktoren stehen HNF4 α nicht mehr zur Verfügung und so wird letztlich die Expression von G6Pc und Pck1 gehemmt. Neben der Inhibition der Glukoneogenese bedingt dieses kompetitive Verhältnis auch die Reduktion von VLDL, da die VLDL Sekretion ebenfalls durch HNF4 α vermittelt wird (Hayhurst *et al.* 2001, Li *et al.* 2014).

Die von L. G. und L. R. durchgeführten quantitativen PCRs bestätigten die beschriebenen Expressionsabnahmen für G6Pc, Pck1, PPAR α und Srebf1 kurz nach TCPOBOP Exposition und wiesen darüber hinaus für alle vier Gene die anhaltende Reduktion der mRNA-Level für mindestens neun Wochen nach. In Anbetracht der Tatsache, dass keine dauerhaften Veränderungen der Basalglukose detektiert werden konnten, scheint die anhaltend verminderte Expression von G6Pc und Pck1 zunächst allerdings widersprüchlich. Da die Glukosehomöostase auf Grund ihrer zentralen Rolle jedoch sehr streng reguliert wird (Otto Buczkowska *et al.* 2001, Triplitt 2012), kann man vermuten, dass möglicherweise regulative Maßnahmen, wie beispielsweise eine angepasste Insulinsekretion oder Kompensation durch die renale Glukoneogeneseaktivität (Gerich *et al.* 2001) langfristige phänotypische Konsequenzen verhindern.

Das Apolipoprotein von HDL ApoA1 hingegen zeigte wider Erwarten zunächst keine Expressionsveränderungen. Erst 12 Wochen nach der Injektion von TCPOBOP konnte eine signifikante Reduktion detektiert werden, was einen sekundären Effekt nahelegt. Dieser

könnte möglicherweise eine Reaktion auf die anhaltende Abnahme der VLDL- und LDL-Konzentrationen sein, die bedingt, dass weniger überschüssiges Cholesterin in der Peripherie vorliegt, das durch HDL zur Leber transportiert werden muss. Die Diskrepanz zur von Masson et al. (2008) beschriebenen Reduktion der ApoA1 Konzentration bereits fünf Tage nach TCPOBOP Exposition lässt sich methodisch erklären. Da Masson et al. (2008) das mit HDL-Micellen assoziierte ApoA1-Protein im Serum gemessen haben, entspricht ihre Messung dem von uns ebenfalls detektierten Rückgang von Serum-HDL. Die in der F₁ Generation beobachtete signifikante Expressionssteigerung unter hochkalorischer Ernährung geht bei genauer Betrachtung - zumindest anteilig - auf eine verminderte Expression der Kontrollgruppen im Vergleich zu den normalkolorisch gefütterten Tieren zurück. Dieser Rückgang widerspricht jedoch sowohl bisherigen Beobachtungen konsistenter Expressionswerte unter hochkalorischer Ernährung (Azrolan *et al.* 1995, Lee *et al.* 2012), als auch der parallel detektierten steigenden Konzentration von HDL im Serum hochkalorisch ernährter Mäuse (vgl. 3.2.3, Abb.18). Unabhängig von diesem bislang unerklärlichen Rückgang der ApoA1 Expression in den Kontrolltieren, zeigen die Nachkommen exponierter Weibchen für ApoA1 eine Expressionssteigerung. Diese somit konsistent für alle untersuchten Gene des Energiemetabolismus detektierte tendenzielle Expressionserhöhung steht im direkten Widerspruch zu den gleichgerichteten physiologischen Effekten beider Generationen, die im Glukosetoleranztest und bei den Untersuchungen der Serumcholesterine detektiert wurden. Diese Umkehr der Expressionsregulation ist dabei möglicherweise auf fötale Programmierung zurückzuführen. Wie bereits in der Einleitung im Zusammenhang mit dem niederländischen Hungerwinter erwähnt (vgl. 1.6), erlaubt die Entwicklungsplastizität es Föten sich bereits im Mutterleib epigenetisch an die zukünftige Umwelt anzupassen (Gluckman *et al.* 2011). So könnte die reduzierte Expression der Gene in der Mutter schlechte Bedingungen für die entsprechenden Stoffwechselwege nahelegen, weshalb diese im Fötus so angepasst werden, dass sie besonders effizient arbeiten. Zusätzlich wird die Expressionssteigerung der Gene des Energiemetabolismus eventuell dadurch begünstigt, dass grundsätzlich eine Tendenz zur Erwartung niedrigerer Nahrungskapazitäten vorherrscht, da es für die Nachkommen kurzfristig schlimmere Konsequenzen hat ein hohes Nahrungsangebot zu erwarten und dann unterernährt zu sein als umgekehrt (Gluckman *et al.* 2011). Unabhängig vom zugrundeliegenden Mechanismus belegt der Widerspruch zwischen Genexpression und Phänotyp, dass die untersuchten Gene nicht in direktem kausalem Zusammenhang zu den beobachteten physiologischen Konsequenzen stehen. Die molekulare Ursache der CAR-vermittelten anhaltenden und generationsübergreifenden Veränderungen im Energiemetabolismus bleibt somit weiterhin unklar.

Im Fokus zukünftiger Untersuchungen zur Glukosehomöostase sollte die Insulinregulation stehen, wobei neben der Bestimmung von basalem Insulin auch Glukose- und

Insulintoleranztests nach längerer hochkalorischer Ernährung oder auch hyperglykämische oder hyperinsulinämische-euglykämische Schellen aufschlussreich sein könnten (Ayala *et al.* 2010). Sollten bei diesen Experimenten Veränderungen im Insulinhaushalt auffallen, könnten diese möglicherweise auf das erhöhte hormonell aktive Serum-Osteocalcin zurückzuführen sein, da dieses die β -Zell-Proliferation und Insulinsekretion im Pankreas stimuliert, die Insulinsensitivität in Fettgewebe, Muskeln und Leber fördert und den muskulären Energieverbrauch steigert (Karsenty und Ferron 2012, Patti *et al.* 2013). Hinsichtlich des Cholesterinprofils sollte das Augenmerk zum Beispiel durch Stuhluntersuchungen auf Veränderungen in der biliären Exkretion gerichtet werden, da nach TCPOBOP Exposition bereits die Hochregulation der für die Umsetzung von Cholesterin zu Gallensalzen nötigen Gene und der zugehörigen Transporter MRP2 und MRP3 (Chai *et al.* 2016) sowie eine Verringerung der hepatischen Gallensäuren, eine veränderte Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit und ein erhöhter Gallenfluss detektiert wurden (Lickteig *et al.* 2016, Yan *et al.* 2015).

Die anhaltend und generationsübergreifend positive Beeinflussung von Körpergewicht, Glukosetoleranz und Cholesterin könnten CAR nach genauer Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen zu einer attraktiven Zielstruktur der Erforschung neuer Behandlungsansätze für Adipositas und assoziierte metabolische Erkrankungen wie Hypercholesterinämie oder Diabetes Mellitus machen. Die Häufigkeit von Übergewicht und davon begünstigten Erkrankungen nimmt auf Grund des vorherrschenden Nahrungsüberflusses und der Tatsache, dass Übergewicht während der Schwangerschaft das Adipositas-Risiko der Nachkommen erhöht (Boney *et al.* 2005), unaufhaltsam zu und hat bereits epidemische Ausmaße erreicht (Parikh *et al.* 2007, RWJF 2016, Triplitt 2012, WHO 2016b). Nach Daten der WHO waren 2014 39% aller Erwachsenen weltweit übergewichtig und bereits 2008 zeigten etwa 40% der Weltbevölkerung erhöhte Cholesterinspiegel (WHO 2016a, c). Darüber hinaus leiden zwischenzeitlich mehr als 400 Mio. Patienten an Diabetes (8,5% der Weltbevölkerung), da die Prävalenz allein von 1990 bis 2000 um 49% gestiegen ist, wobei zunehmend mehr Kinder und junge Menschen betroffen sind (Mancini 2009, Triplitt 2012, WHO 2016b).

Der massiv zunehmende Inzidenz von Adipositas, assoziierten metabolischen Erkrankungen und kardiovaskulären Folgeerscheinungen wie Arteriosklerose, Herzinfarkt oder Schlaganfall steht bislang eine eingeschränkte Palette nachweislich das kardiovaskuläre Risiko und die Mortalität senkender Medikamente gegenüber. Im Bereich der oralen Antidiabetika beispielsweise beeinflussen lediglich Metformin, welches durch Hemmung der Gluconeogenese wirkt (Gao und Xie 2010, Miller *et al.* 2013) und Sulfonylharnstoffe die klinischen Endpunkte nachweislich positiv (ÄZQ-Leitlinie Typ-2-Diabetes). Allerdings sind

Sulfonylharnstoffe für die Langzeitmonotherapie nur bedingt geeignet, da sie Gewichtszunahmen begünstigen und die β -Zellen des Pankreas durch die blutglukose-unabhängige Stimulation der Insulin-Freisetzung langfristig ausbrennen (ÄZQ-Leitlinie Typ-2-Diabetes). Die Therapie der Hypercholesterinämie basiert sogar nahezu ausschließlich auf dem Einsatz von HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren (Statinen), da weiteren zugelassenen Lipidsenkern wie beispielsweise Fibraten eindeutige und konsistente Belege zur Reduktion des kardiovaskulären Risikos und der Mortalität fehlen (AKDAE-Handlungsleitlinien Fettstoffwechselstörungen). Entsprechend gehören Statine in den Industrienationen zu den meist verschriebenen Medikamenten (Marino *et al.* 2011), trotzdem sie das Risiko an Diabetes zu erkranken erhöhen und auf Grund ihrer engen therapeutischen Breite schwerwiegende Nebenwirkungen wie Rhabdomyolyse hervorrufen können (Sattar *et al.* 2010, Sattar *et al.* 2014). Insbesondere die vielen metabolischen Erkrankungen zugrundeliegende Adipositas kann bislang kaum medikamentös behandelt werden. Adjuvant zu einer Diät kann nach Leitlinie nur der Lipasehemmer Orlistat eingesetzt werden (DAG-Leitlinie Adipositas).

Um die Eignung von CAR als medikamentöse Zielstruktur für Diabetes, Hypercholesterinämie oder Adipositas abschätzen zu können, müsste neben den den Energiemetabolismus beeinflussenden Mechanismen auch die Übertragbarkeit der tierexperimentellen Ergebnisse ins humane System untersucht werden. Da bei der Behandlung von Diabetikern mit Phenobarbital vergleichbare Veränderungen des Blutzuckerspiegels beobachtet wurden (Lahtela *et al.* 1985) und bereits gezeigt werden konnte, dass CAR Induktion auch in humanen Hepatozyten inhibierend auf die Glukoneogenese wirkt (Lynch *et al.* 2014), kann man annehmen, dass die Effekte auf den Glukosehaushalt spezieübergreifend auftreten. Hinsichtlich des Serumlipidprofils gibt es allerdings erhebliche Unterschiede zwischen Mensch und Maus. Während bei Mäusen HDL mit etwa 60-80% den Großteil der Lipoproteine ausmacht (Han *et al.* 2013, S. Li *et al.* 2016), liegt der humane HDL Gehalt physiologisch bei nur etwa 20% (Forti und Diament 2006) und LDL stellt die bei weitem größte Cholesterinfraktion. Noch dazu wurden bei Patienten nach Behandlung mit dem CAR-aktivierenden Antikonvulsivum Phenytoin nicht erniedrigtes, sondern erhöhtes Serum HDL und Gesamtcholesterin gemessen (Chai *et al.* 2016), was eher negative Effekte einer CAR Aktivierung auf den humanen Cholesterinhaushalt vermuten lässt. Obwohl im Mausmodell generierte Forschungsdaten zum Medikamentenstoffwechsel humane Reaktionen häufig nicht akkurat wiedergeben (Chai *et al.* 2016), werden präklinische in vivo Studien auf Grund der guten Modelleigenschaften typischerweise in Nagern durchgeführt (Aleksunes und Klaassen 2012, di Masi *et al.* 2009). Eine Absicherung der murinen Forschungsergebnisse kann anschließend beispielsweise durch Wiederholung der Versuche in Schweinen, welche im Mittel dem Menschen ähnlicher sind und häufig vergleichbare Reaktionen auf die Exposition mit Fremdstoffen durch die höhere Homologie von pgCAR und hCAR zeigen (Chai *et al.* 2016),

durch die Verwendung humanisierter Tiermodelle oder durch in vitro-Testung in primären Humanzellen oder immortalisierten menschlichen Zelllinien erreicht werden.

Da sich die bisherige Forschung zu CAR häufig auf die Leber fokussierte und die physiologische Rolle des Rezeptors in anderen exprimierenden Organen wie beispielsweise Dünndarm oder Niere (Swales und Negishi 2004) somit bislang kaum untersucht wurde, müsste darüber hinaus auch ermittelt werden, wie sich die Induktion in diesen Geweben auswirken würde (Chai *et al.* 2013). Wie die beschriebenen Squelching Effekte in Knochen- und Energiestoffwechsel gezeigt haben, gilt es dabei nicht zuletzt Interferenzen mit anderen nukleären Rezeptoren zu beachten, um potentielle Nebenwirkungen einer gezielten medikamentösen Aktivierung abschätzen zu können.

4.4 Die Transmission der CAR vermittelten Effekte geht auf die Übertragung von TCPOBOP durch die Muttermilch zurück

Die beschriebenen generationsübergreifenden Veränderungen im Energiestoffwechsel und in der metabolischen Kapazität des Fremdstoffmetabolismus haben - unabhängig vom zugrundeliegenden Übertragungsmechanismus - medizinisch hohe Relevanz, da sie nahelegen, dass die Exposition gegenüber Medikamenten oder anderen Fremdstoffen bereits lange vor der Konzeption erhebliche Beeinflussungen der Gesundheit von Mutter und Kind nach sich ziehen könnte. Um zukünftig verschiedene Xenobiotika anhand ihrer individuellen Stoffeigenschaften - hinsichtlich des Risikos vergleichbare generationsübergreifende Effekte auch im Menschen zu induzieren - untersuchen zu können, ist die genaue mechanistische Aufklärung der Transmissions-Vorgänge dennoch von fundamentaler Bedeutung. Ausgehend von den Ergebnissen der Arbeit von Frau Dr. Mathäs (2014) könnten die multigenerationalen Konsequenzen der CAR-Aktivierung entweder auf die Einführung epigenetischer Veränderungen im Promotorbereich von CAR-Zielgenen (Chen *et al.* 2012) in Keimzellen oder auf eine direkte Exposition der Nachkommen durch Akkumulation des hochpotenten, lipophilen Liganden TCPOBOP im Fettgewebe (Poland *et al.* 1980, Smith *et al.* 1993) und sukzessive Übertragung durch die Plazenta bzw. Muttermilch zurückzuführen sein. Während die Exklusivität der Induktion von Cyp2b10 für stabile epigenetische Veränderungen in den Keimzellen spricht, da bei einer direkten Exposition eine Induktion aller Zielgene zu erwarten wäre, deuten das Ausbleiben transgenerationaler Effekte sowie die scheinbar exklusiv maternale Transmission auf direkte Exposition hin.

Da die Versuche von Frau Dr. Mathäs lediglich eine paternale Übertragung nach Exposition von reifen Spermatozoen ausschlossen, wurden von T. G. während ihrer Masterarbeit zunächst mehrere Entwicklungsstadien der Spermatogenese untersucht, um auch mögliche Wendepunkte der Gametogenese, die ein Xenobiotika-sensitives Fenster begrenzen könnten,

wie beispielsweise den im Stadium der Spermatozyten einsetzenden Schutz durch die Blut-Hoden-Schranke (Wong und Cheng 2005), zu berücksichtigen (vgl. 3.3.1). Während für Nachkommen, welche auf exponierte Spermatiden oder Spermatogonien zurückgehen, keine Expressionsunterschiede nachgewiesen werden konnten, zeigten F₁ Mäuse, welche aus der Befruchtung von Eizellen mit Spermien entstanden, die zum Zeitpunkt der TCPOBOP-Behandlung Spermatozyten waren, eine etwa dreifach erhöhte hepatische Cyp2b10 Expression. Diese wenn auch schwache Induktion kann, da der paternale Einfluss mit der Befruchtung endet, nur durch die Spermien selbst oder andere Bestandteile der Samenflüssigkeit vermittelt werden. Ausgehend von den in der Literatur beschriebenen epigenetischen Veränderungen im Promotorbereich von Cyp2b10 (Chen *et al.* 2012, Lempiainen *et al.* 2011) ist es vorstellbar, dass die Exposition mit TCPOBOP aktivierende Histonmodifikationen am Cyp2b10 Promotor der Spermatozyten zur Folge hatte. Diese könnten dem im Rahmen der meiotischen Reifeteilungen einsetzenden epigenetischen Remodelling sowie dem Austausch durch Protamin entgehen, da dabei etwa 1 % der Histone erhalten bleiben (Hughes 2014). Dies würde auch das Ausbleiben einer Induktion in Spermatiden erklären, da in diesen die epigenetischen Veränderungen bereits abgeschlossen sind und das Chromatin durch die Protaminverpackung stabilisiert wird. Da die Transkription in Spermatogonien stark eingeschränkt ist (Holland und Rakyán 2013), könnte das Ausbleiben generationsübergreifender Expressionsveränderungen in diesem Stadium darauf hindeuten, dass die aktivierenden Histonmarker in transkriptionellen Prozessen, beispielsweise durch histonmodifizierende Cofaktoren von CAR wie SRC-1 (Takizawa *et al.* 2010), angelegt werden. Entsprechend dieser Theorie existiert möglicherweise ein sehr kleines Zeitfenster im Verlauf der Spermatogenese, welches stabile epigenetische Veränderungen durch CAR zulässt. Da die generationsübergreifende Induktion jedoch im Vergleich zu der bei der Transmission in der weiblichen Linie beobachteten 600-fachen Expressionssteigerung (vgl. 1.7) quantitativ vernachlässigbar erscheint, konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf die Übertragung durch die Mutter.

Die klare Differenzierung zwischen den postulierten präkonzeptionellen, epigenetischen Veränderungen in Oozyten und postkonzeptionellen Effekten durch intrauterine oder postnatale Exposition wurde durch IVF- und Embryotransfer-Experimente erreicht (vgl. 3.3.2) (Francis *et al.* 2003, Toth 2015). Beide Experimente belegten eindeutig, dass der Induktionsstatus der Amme und nicht derjenige der biologischen Mutter entscheidend für die hepatische Cyp2b10 Expression der Nachkommen ist, was präkonzeptionelle Effekte ausschließt und zeigt, dass die Übertragung postkonzeptionell im Verlauf von Schwangerschaft oder Brutpflege erfolgt. Eine vergleichbare Dominanz der austragenden Mutter wurde auch hinsichtlich fötalem Wachstum nach humanen Oozytenspenden

beobachtet, bei denen die Geburtsgröße in der Regel enger mit der Empfängerin als der Eizellenspenderin korreliert (Gluckman *et al.* 2011).

Die nachfolgend durchgeführten Fremdpflegeversuche (vgl. 3.3.3) wiederum belegten, dass die Transmission primär auf eine postnatale TCPOBOP Exposition durch die Muttermilch und nur in sehr geringem Ausmaß auf intrauterinen Kontakt zurückzuführen ist. Da jedoch auch Effekte nach intrauterinem Kontakt auftreten, scheint die Plazentaschranke – wie bereits die molekulare Struktur von TCPOBOP (klein, lipophil) vermuten lässt (Gallenberg und Vodcnik 1987) - keinen Schutz vor TCPOBOP zu bieten. Das geringe Ausmaß der intrauterinen Effekte ist demnach vermutlich eher auf die massiven Veränderungen des fötalen Lebermetabolismus rund um die Geburt (Peng *et al.* 2012) sowie auf das - insbesondere vor dem dritten Trimenon- fehlende fötale Fettgewebe (Anblagan *et al.* 2013), in welchem TCPOBOP akkumulieren könnte, zurückzuführen. Vorstellbar wäre auch die Assoziation von TCPOBOP an eine Plasmakomponente, welche nicht plazentagängig ist. So wurde beispielsweise für PCB 153 (Polychloriertes Biphenyl 153), welches hinsichtlich seiner physikochemischen Eigenschaften starke Ähnlichkeit zu TCPOBOP aufweist und ebenfalls primär über die Muttermilch an Nachkommen übertragen wird, die Distribution entlang des wässrigen Kreislaufsystems durch Bindung an Lipoproteine gezeigt (Gallenberg und Vodcnik 1987, Lee *et al.* 2007). Zwar ist bislang unklar ob die Bindung von PCB 153 an bestimmte Einzelkomponenten der Lipoproteine oder durch Aufnahme in den unpolaren Kern erfolgt, doch es konnte bereits nachgewiesen werden, dass der lipophile Fremdstoff gegen Ende der Schwangerschaft und während der Laktation hauptsächlich an VLDL gebunden vorliegt, welches das Hauptsubstrat der Lipoproteinlipase (LPL) im Milchdrüsen Gewebe ist (Gallenberg und Vodcnik 1987, Lee *et al.* 2007). Da die hormonell bedingte Verringerung der LPL-Aktivität im Fettgewebe und die parallel erfolgende Zunahme der LPL-Aktivität in den Milchdrüsen ab dem Ende der Schwangerschaft für die vermehrte Spaltung von VLDL im Drüsen Gewebe und die Aufnahme der darin enthaltenen Triglyzeride sorgt, werden auch assoziierte lipophile Xenobiotika nicht mehr ans periphere Fettgewebe, sondern an die Milchdrüsen abgegeben (Lee *et al.* 2007). Verstärkt wird dieser Effekt, da während der Schwangerschaft Fettgewebe eher aufgebaut, als abgebaut wird; bestehendes Fettgewebe wird erst während der energetisch aufwendigen Laktation mobilisiert, wodurch auch darin gespeicherte lipophile Fremdstoffe frei werden (Lederman 2004, Ring *et al.* 1990). Bei der Übertragung dieser Tierversuchsergebnisse ins menschliche System gilt es zu berücksichtigen, dass humane Muttermilch einen deutlich geringeren Fettgehalt hat als beispielsweise die Milch von Mäusen (Gallenberg *et al.* 1990). Die benötigte Energie kann in den westlichen Industrienationen häufig zu einem großen Teil durch die fettreiche Ernährung abgedeckt werden, wodurch weniger Fettgewebe mobilisiert werden muss. Dies resultiert in der Übertragung geringerer Mengen im Fett gespeicherter Xenobiotika, wie Tierversuche zur Übertragung von PCB 153 unter hochkalorischer Diät

belegen (Ring *et al.* 1990). Zusätzlich bremst die kleinere Anzahl an Nachkommen die Milchproduktion und damit auch die Eliminierung der akkumulierten Giftstoffe der Mutter; die einzelnen Nachkommen werden bezogen auf die übertragene Menge jedoch im Schnitt stärker belastet, da die Milch nicht auf mehrere Nachkommen verteilt wird (Gallenberg *et al.* 1990, Ring *et al.* 1990).

Hinsichtlich der Transmission durch die Muttermilch ist es - ausgehend von der Anwesenheit von Phase III Enzymen im Milchdrüsen Gewebe – darüber hinaus sogar vorstellbar, dass TCPOBOP aktiv in die Muttermilch sezerniert wird. So wird beispielsweise der Effluxtransporter BCRP (Breast Cancer Resistance Protein; ABCG2) stark in Milchdrüsen expremiert, was einerseits die Abgabe von Riboflavin (Vitamin B2) in die Milch ermöglicht, andererseits aber auch zur Sekretion von Nahrungskarzinogenen wie Aflatoxin B1 oder Medikamenten wie Doxorubicin, Methotrexat oder Pantoprazol führt (Ho und Burggren 2010). Die Belastung von Säuglingen mit potentiell toxischen Xenobiotika scheint zunächst im direkten Widerspruch zu dem energetisch aufwändigen Schutz durch die Plazentaschranke während der Schwangerschaft zu stehen. Ausgehend von der hohen Entwicklungsplastizität Neugeborener ist es jedoch vorstellbar, dass die aktive Konfrontation mit geringen Dosen der vorherrschenden Fremdstoffe der Vorbereitung auf die zukünftige Umwelt dient (Gluckman *et al.* 2011, Lopomo *et al.* 2016).

Basierend auf der Akkumulation von TCPOBOP im Fettgewebe (Poland *et al.* 1980) und der Muttermilch-vermittelten direkten Exposition der Nachkommen, wäre eine anhaltende und multigenerationale Induktion aller CAR Zielgene zu erwarten gewesen, so dass die von Chen *et al.* (2012) und Frau Dr. Mathäs (2014) beobachtete Exklusivität von Cyp2b10 zunächst widersprüchlich erscheint. Der im Rahmen dieser Arbeit vorgenommene direkte Vergleich der TCPOBOP-vermittelten Induktion von Cyp2b10, Cyp3a11 und Cyp2c29 (vgl. 3.3.4) zeigt jedoch, dass auch die massiven Unterschiede in der Sensitivität der Zielgene eine mögliche Erklärung für die scheinbar exklusive Aktivierung von Cyp2b10 bieten können. Eine mit der Online-Applikation NHR-Scan (Sandelin und Wasserman 2005) durchgeführte Analyse der erweiterten Promotorregion (6 kb; mm10) von Cyp2b10 belegte (vgl. A3 Tab. A 4), dass neben dem etwa 2,3 kb vor dem Transkriptionsstart lokalisierten PBREM-Enhancer Modul (Honkakoski und Negishi 1997) elf weitere mögliche Bindestellen für nukleäre Rezeptoren existieren, wovon insbesondere vier der identifizierten Erkennungssequenzen - nämlich die beiden DR4- (Omiecinski *et al.* 2011a, 2011b), das ER8- (Kobayashi *et al.* 2015) und das DR2-Motiv (Honkakoski *et al.* 2003) - präferiert von CAR gebunden werden. Im erweiterten Promotorbereich von Cyp3a11 hingegen, welches keine andauernde oder multigenerationale Induktion zeigt und etwa die 1000-fache Dosis TCPOBOP zum Erreichen vergleichbarer Effekte benötigt, finden sich kein Enhancer-Modul und lediglich ein von CAR besonders

effektiv gebundenes DR4-Element (Honkakoski *et al.* 1998). Die darüber hinaus identifizierten ER6- und DR3-Motive werden zwar ebenfalls mit geringerer Affinität von CAR gebunden (Omiecinski *et al.* 2011a, 2011b, Wei *et al.* 2002), zeigen aber insbesondere, dass Cyp3a11 neben CAR auch durch PXR reguliert wird (Cheng *et al.* 2005, Tojima *et al.* 2012), da dieses präferiert DR3-, DR5- und ER6-Elemente bindet (Mackowiak und Wang 2016, Omiecinski *et al.* 2011b). Cyp2c29 hingegen, welches im Versuch erst bei etwa 100-fach höheren Dosen TCPOBOP zu Cyp2b10 vergleichbare Induktionslevel erreichte, fehlt zwar das PBREM-Enhancer-Modul, allerdings finden sich im erweiterten Promotorbereich vier der von CAR hochaffin gebundenen DR4-Elemente. Die demnach eher unerwartet schwache Induktion geht vermutlich auf die deutlich höhere Basalexpression von Cyp2c29 im Vergleich zu Cyp2b10 in adulten Tieren (Peng *et al.* 2012) zurück, welche zu einer geringeren Induzierbarkeit führt. Wie hoch die Sensitivität von Cyp2c29 in Wirklichkeit ist, zeigte sich bereits in der Hochdurchsatzsequenzierung von Frau Dr. Marianne Mathäs (2014), in welcher es in neugeborenen Mäusen - die eine niedrigere Basalexpression haben (Peng *et al.* 2012) - zunächst sogar stärker als Cyp2b10 induziert wurde. Derartige altersabhängige Veränderungen der Expressionsstärke von Cytochrom P450 Enzymen sind für zahlreiche Isoformen auch im humanen System beschrieben; so wird beispielsweise CYP3A7 nur im Kindesalter expremiert (Tateishi *et al.* 1997). Entsprechend dieser Erkenntnisse fiel bei der erneuten Auswertung der Sequenzierungsrohdaten von Frau Dr. Mathäs auf, dass auch die Expression von Cyp2c29 generationsübergreifend beeinflusst ist, was allerdings auf Grund der hohen Basalexpression adulter Tiere nur in Neugeborenen nachweisbar war.

4.5 Erste Untersuchungen klinisch relevanter Induktoren zeigen keine generationsübergreifenden Effekte

Während toxikologisch häufig generationsübergreifende Analysen durchgeführt werden, werden Medikamente in der Regel nur hinsichtlich ihrer Wirkung und Nebenwirkungen im behandelten Patienten untersucht und mögliche Konsequenzen für die Nachkommen von Patientinnen im gebärfähigen Alter werden fast ausschließlich bei Einnahme während Schwangerschaft und Stillzeit berücksichtigt. Trotzdem TCPOBOP selbst medizinisch nicht relevant ist, sind vergleichbare generationsübergreifende Effekte einschließlich der beschriebenen, weitreichenden Konsequenzen auch im humanen System vorstellbar. Entsprechend wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Phenobarbital, Phenytoin und Carbamazepin auch einige der klinisch am häufigsten angewandten CAR Aktivatoren getestet (vgl. 3.4).

Ausgehend von dem identifizierten Mechanismus, beruhend auf Akkumulation im Fettgewebe, war es jedoch nicht überraschend, dass die untersuchten Medikamente, welche deutlich

weniger lipophil sind als TCPOBOP, keine anhaltende Induktion hervorrufen. So liegt der die Lipophilie einer Substanz quantifizierende Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ($\log P$) von TCPOBOP mit 5,91 sehr hoch, da TCPOBOP sich erheblich besser in Octanol als in Wasser löst. Die $\log P$ -Werte von Carbamezepin (2,97), Phenytoin (2,45) und Phenobarbital (1,72) hingegen sind sehr viel niedriger, was widerspiegelt, dass sie sich in dem Zweiphasensystem aus Octanol und Wasser zu erheblich größeren Anteilen in Wasser lösen. Wie deutlich der Unterschied in der Lipophilie tatsächlich ist wird klar, wenn man bedenkt, dass TCPOBOP für die durchgeführten Versuche in purem Maiskeimöl aufgenommen wurde, wohingegen Phenobarbital ohne Schwierigkeiten im Trinkwasser gelöst verabreicht werden konnte. Somit sollte - ausgehend von der geringeren Lipophilie - keines der untersuchten Medikamente im Fettgewebe akkumulieren, was darüber hinaus auch durch die Metabolisierung der Antiepileptika in der Leber verhindert wird. So wird beispielsweise Carbamazepin unter anderem durch CYP3A-Enzyme in mehr als 30 Metabolite umgesetzt, welche hauptsächlich über den Urin ausgeschieden werden (Amore *et al.* 1997, Park *et al.* 2012). Phenytoin wiederum wird primär durch CYP2C9 - aber auch durch CYP2C19 - zunächst zu p-Hydroxyphenytoin metabolisiert, bevor es durch UGT1A1, UGT1A9 und UGT2B15 glucuronidiert und über den Harn exkretiert wird (Nakajima *et al.* 2007). Ähnlich zu Phenytoin wird auch Phenobarbital zunächst durch CYP2C19 hydroxyliert und nach Addition an Glucuronsäure über die Nieren ausgeschieden (Lynch und Price 2007). Im Unterschied dazu ist TCPOBOP inert gegenüber der Biotransformation (Poland *et al.* 1980), was zu einer enormen biologischen Residualzeit führt, die die Bildung des Depots im Fettgewebe sowie die sukzessive Freisetzung und die daraus resultierende anhaltende Induktion von Cyp2b10 in der exponierten F_0 Generation ermöglicht.

Basierend auf der geringen den F_0 Tieren verabreichten Menge TCPOBOP erschien es zunächst fragwürdig, ob die über die Muttermilch an die Nachkommen übertragene Menge ausreichend ist, ein entsprechendes Depot auch in der F_1 Generation zu formen, insbesondere da Jungtiere sehr viel weniger Fettgewebe haben. Die ersten Ergebnisse der HPLC-MS Analysen zeigen jedoch deutlich, dass TCPOBOP auch im Fettgewebe adulter Nachkommen exponierter Weibchen vorhanden ist (vgl. 3.3.5). Trotzdem die Quantifizierung in der F_1 Generation noch aussteht, lassen die Versuche Mengen im Bereich derjenigen vermuten, welche in F_0 Tieren nachgewiesen werden konnte, die drei Tage zuvor mit einer 100- bis 500-fach geringeren Dosis TCPOBOP (0,006 mg/kg bis 0,03 mg/kg) behandelt wurden (vgl. A3 Abb. A 9). Da die untersuchten F_1 Böcke eine etwa 30-fache Expressionssteigerung von Cyp2b10 aufweisen und auch die mit niedrigeren TCPOBOP Dosen behandelten F_0 Tiere Induktionswerte in diesem Bereich zeigen (vgl. A3 Tab. A 3), ist davon auszugehen, dass die mit der Muttermilch übertragene Menge TCPOBOP ausreicht, um die langfristige Induktion der F_1 Generation zu erklären.

4.6 Beurteilung des Risikopotentials anderer anthropogener Substanzen

Der für TCPOBOP identifizierte bioakkumulative Mechanismus beruhend auf der hohen Lipophilie und der nahezu vollständigen Trägheit gegenüber der Biotransformation legt nahe, dass insbesondere Substanzen mit ähnlichen Stoffeigenschaften potentiell vergleichbare Effekte hervorrufen könnten. Strukturell enge Verwandtschaft zu dem als Verunreinigung in Insektiziden nachgewiesenen TCPOBOP (di Masi *et al.* 2009, Smith *et al.* 1993) sowie ähnlich hohe Lipophilie findet sich insbesondere bei zahlreichen Pestiziden.

Während Dünger, Insektizide und Herbizide im vergangenen Jahrhundert zunächst nahezu inflationär als Wunderwaffen eingesetzt wurden und so erhebliche Anstiege der Welt-Nahrungsproduktion ermöglichten (di Masi *et al.* 2009, WHO 2010), erkannte man in den letzten Jahren zunehmend das Risiko, welches diese als POPs (persistent organic pollutants) zusammengefassten synthetischen, organischen Verbindungen für Mensch und Umwelt bergen. Das hohe Gefährdungspotential geht dabei in der Regel nicht auf die gut charakterisierte akute Toxizität zurück, sondern insbesondere auf die auch bei TCPOBOP beobachtete hohe Lipophilie und Trägheit gegenüber dem Metabolismus, welche die Persistenz der Substanzen in der Umwelt sowie die Akkumulation in Nahrungsketten ermöglichen (Jones und de Voogt 1999). Diese Anreicherung von Giftstoffen, welche hauptsächlich durch die Nahrung aufgenommen werden, ist besonders kritisch für Spitzenprädatoren wie den Menschen und wurde bislang hauptsächlich in aquatischen Nahrungsketten anhand piscivorer Meeressäuger und Seevögel intensiv untersucht (Bruggeman *et al.* 1984, Jones und de Voogt 1999). Trotzdem die in der Umwelt nachgewiesene Menge vieler POPs auf Grund lokaler und globaler Nutzungsbegrenzungen und -verbote wie dem Stockholmer Übereinkommen von 2001 deutlich gesunken ist (Jones und de Voogt 1999, van den Berg *et al.* 2017) und die unmittelbare Exposition somit unter toxikologisch relevanten Dosen liegt, kann durch die Akkumulation im Laufe des Lebens eine massive Belastung entstehen. Ausgehend davon, dass beispielsweise Kegelrobben innerhalb von etwa 20 Tagen Laktationszeit bis zu 20 Prozent ihrer über Jahre akkumulierten Giftstoffe an ihre Nachkommen weitergeben (Jones und de Voogt 1999) und Mäuse innerhalb von 14 Tagen ihre vollständige PCB Belastung in die Muttermilch eliminieren (Deichmann *et al.* 1975, Gallenberg *et al.* 1990, Gallenberg und Vodcnik 1987), könnte dies insbesondere für Neugeborene eine ernsthafte Gefährdung bedeuten. Zwar zeigen humane Muttermilch Überwachungsprogramme aus Deutschland und Schweden sowie fortlaufende Studien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und der Vereinten Nationen im Rahmen des UNEP (United Nations Environment Program), dass die Belastung mit frühzeitig gebannten

Pestiziden wie DDT deutlich zurückgegangen ist, jedoch belegen sie auch, dass die Konzentrationen vieler anderer agrochemisch oder industriell genutzter POPs wie beispielsweise PCBs (Polychlorierte Biphenyle), PCDDs (Dioxine) und PCDFs (Furane) noch immer signifikant über dem als toxikologisch sicher eingeschätzten Level liegen (Solomon und Weiss 2002, van den Berg *et al.* 2017). Ausgehend von experimentellen und epidemiologischen Studien, die frühe Entwicklungsphasen als besonders sensitiv gegenüber POP Effekten identifizieren (van den Berg *et al.* 2017), lässt die muttermilchvermittelte Exposition Neugeborener generationsübergreifende Konsequenzen befürchten, wie sie bereits in Säugern nach Exposition mit Pestiziden beobachtet werden konnten (vgl. 1.6). Neben Einschränkungen der männlichen oder weiblichen Fertilität durch Fehlbildungen oder Störungen der Organfunktion, ausgelöst durch Kontakt zu Insektiziden wie Vinclozolin, DDT oder Methoxychlor (Anway *et al.* 2005, Brieno-Enriquez *et al.* 2015, Kalfa *et al.* 2015, Nilsson und Skinner 2015, Skinner 2016), wurden in Tierstudien bislang hauptsächlich erbliche Verhaltensänderungen nach Exposition gegenüber Weichmachern wie BPA und DEHP (Quinnies *et al.* 2015, Salian *et al.* 2009, Skinner 2016) festgestellt.

Da einige der beobachteten Effekte, wie beispielsweise die nach dem Kontakt schwangerer Mäuse mit DEHP beobachteten erhöhten Stress-Hormonlevel inklusive entsprechender Verhaltensauffälligkeiten, noch in der dritten Folgegeneration auftraten und somit transgenerational sind, ging man bislang allgemein von epigenetischen Transmissionsmechanismen aus (Nilsson und Skinner 2015). Bedenkt man jedoch, dass in den vergangenen Jahren für zahlreiche organische Schadstoffe wie Methoxychlor (Blizard *et al.* 2001, Handschin und Meyer 2003, Hernandez *et al.* 2009, Savary *et al.* 2014), DEHP oder BPA (DeKeyser *et al.* 2011) die Aktivierung von CAR oder zumindest - wie für Vinclozolin gezeigt - die Veränderung der Expression und Aktivität hepatischer Cytochrom P450 Enzyme (Cantelli-Forti und Camerino 1998, Hrelia *et al.* 1996) nachgewiesen werden konnte, kann die Beteiligung von CAR an diesen Prozessen nicht ausgeschlossen werden.

Um zu klären ob die generationsübergreifende Aktivierung von CAR, welche in der vorliegenden Arbeit für TCPOBOP nachgewiesen und charakterisiert wurde, künftig in toxikologische Risikobewertungen eingeschlossen werden sollte, müssten zunächst experimentelle Nachweise für multigenerationale CAR vermittelte Effekte nach Pestizidexposition erbracht werden. Ausgehend von dem massiven Einfluss zahlreicher Pestizide auf die hormonellen Systeme des Körpers liegt die Beteiligung eines nukleären Rezeptors am Wirkmechanismus jedoch nahe, da man derzeit davon ausgeht, dass Wechselwirkungen zwischen verschiedenen nukleären Rezeptoren, wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Knochen- und Energiestoffwechsel beschrieben wurden, eine mögliche Erklärung für die häufig beobachtete endokrine Disruption sind (Chai *et al.* 2016). Erste

Ergebnisse zu derartigen Interaktionen zwischen Umweltchemikalien und nukleären Rezeptoren könnten Screening Programme wie das von der US-amerikanischen Umweltschutzbehörde ins Leben gerufene ToxCast Programm (Aleksunes und Klaassen 2012) liefern.

Dass neben hochgradig lipophilen Pestiziden auch Medikamente, welche im Allgemeinen hydrophiler sind und der Biotransformation unterliegen, dauerhafte Veränderungen des Stoffwechsels hervorrufen können, zeigt die von Tien et al. (2015) beobachtete anhaltende Induktion von Cyp2b10 nach Injektion neugeborener Mäuse mit Phenobarbital, die im Widerspruch zu der nach Applikation des Barbiturats beobachteten reversiblen Induktion adulter Tiere zu stehen scheint (vgl. 3.4/4.5; (Luisier *et al.* 2014)).

Die Autoren führen sie auf ein sensitives Fenster in der frühen postnatalen Phase zurück, in welchem stabile epigenetische Veränderungen eingeführt werden können. Allerdings charakterisieren sie dieses Fenster lediglich phänotypisch über die anhaltende Cyp2b10 Induktion und postulieren den epigenetischen Mechanismus basierend auf der Publikation von Chen et al. (2012) zur neonatalen Injektion von TCPOBOP. Trotzdem es gemeinsam mit L. R. im Rahmen ihrer Masterarbeit gelang die anhaltende Cyp2b10 Induktion nach neonataler Phenobarbital-Exposition zu bestätigen (vgl. A3 Abb. A 12), konnte L. R. keine signifikanten Veränderungen des Methylierungsstatus der Histonmarker H3K4 und H3K9 im Promotor von Cyp2b10 mittels Chromatinimmunpräzipitation feststellen, weshalb der zugrundeliegende Mechanismus derzeit noch unklar ist. Allerdings musste die applizierte Dosis Phenobarbital für alle Versuche im Vergleich zu den Beschreibungen von Tien et al. (2015) erheblich reduziert werden, da die Mäuse trotz gleichem genetischen Hintergrund (C57BL/6 J) die beschriebene Applikation von 200 mg/kg nicht überlebten.

Unabhängig vom molekularen Mechanismus und der Tatsache, dass L. R. in ihren Experimenten keine generationsübergreifenden Effekte nach Phenobarbital nachweisen konnte, könnten die Ergebnisse von Tien et al. (2015) medizinisch von hoher Relevanz sein, da Phenobarbital unter anderem in der Klinik zur Therapie Neugeborener bei zerebralen Anfällen (GNPI-Leitlinie Zerebrale Anfälle bei Neugeborenen) oder neonatalem Abstinenzsyndrom genutzt wird (Bartha *et al.* 2007, Davanzo *et al.* 2013, Donovan *et al.* 2016, Kale-Cekinmez *et al.* 2012). Darüber hinaus kann Phenobarbital - trotzdem es nachweislich über die Muttermilch übertragen wird - in niedrigen Dosen auch in der Stillzeit eingesetzt werden (Davanzo *et al.* 2013, Kuhn *et al.* 1988).

Durch die unklaren molekularen Hintergründe kann man derzeit nur vermuten, dass auch andere Medikamente auf Grund der Plastizität der Entwicklungsprozesse bei Exposition in frühen Lebensphasen anhaltende Veränderungen des Stoffwechsels hervorrufen könnten (Gluckman *et al.* 2011). Die pharmakotherapeutische Bedeutung eines derartigen sensitiven

Fensters, welches bereits im Zusammenhang mit metabolischen Erkrankungen (Lopomo *et al.* 2016) diskutiert wurde, zeigt sich insbesondere bei genauer Betrachtung der unerwartet hohen Wahrscheinlichkeit für fötale oder neonatale Medikamenten-Exposition. So erhalten beispielsweise 64% aller Frauen in den USA während der Schwangerschaft Medikamente, um bestehende Vorerkrankungen wie beispielsweise Asthma, Epilepsie oder Bluthochdruck und neu aufgetretene medizinische Probleme zu behandeln und die Gesundheit von Mutter und Kind zu erhalten (Andrade *et al.* 2004, Bright *et al.* 2016, Sachdeva *et al.* 2009). Auch der Einsatz von Pharmaka in der Stillzeit führt heute häufig nicht mehr zum Umstieg auf Muttermilchersatzprodukte. Zwar weiß man, dass mit Ausnahme einiger, weniger klinisch verwendeter Substanzen wie Heparin und Insulin, nahezu alle Medikamente in unterschiedlichem Ausmaß in die Muttermilch übertragen werden (Medsafe 2015, Platzker *et al.* 1980), dennoch schätzt man zum Beispiel bei den Antikonvulsiva Carbamazepin, Valproat und Phenytoin (Bar-Oz *et al.* 2000, Davanzo *et al.* 2013), den meisten Antibiotika und einigen Analgetika wie Paracetamol (Bar-Oz *et al.* 2003) die gesundheitlichen Vorteile des Stillens höher ein als das Risiko der geringen dabei übertragenen Dosis des Pharmakons (Bar-Oz *et al.* 2003, Hotham und Hotham 2015).

4.7 Relevanz in Pharmakotherapie und Pharmakovigilanz

Auch unabhängig vom Risikopotential einzelner Medikamente könnte die generationsübergreifende und anhaltende Veränderung der metabolischen Kapazität des Lebermetabolismus humanmedizinisch von hoher Relevanz sein, da sie eine mögliche Erklärung für den bislang ungeklärten Anteil interindividueller Varianz (Yang und Wang 2014) in der Reaktion auf Arzneimittel liefert (vgl. 1.5). Basierend auf den Daten der vorliegenden Arbeit könnten möglicherweise nicht nur genetische Polymorphismen, Induktion oder Inhibition durch akute Exposition sowie Vorerkrankungen von Leber oder Niere den Erfolg einer Pharmakotherapie beeinflussen, sondern ebenso Expressionsunterschiede, welche im Verlauf des Lebens durch Fremdstoffexposition entstanden sind (Christensen *et al.* 2009, Mirbahai und Chipman 2014). Sollte dies der Fall sein, könnte die Aufklärung der individuellen Stoffwechselkapazität langfristig beispielsweise genutzt werden, um Dosierungen von Arzneimitteln zu individualisieren und so Therapieversagen, Nebenwirkungen und Toxizitäten zu vermeiden (Heller 2013).

Entsprechend des für TCPOBOP identifizierten Mechanismus ist davon auszugehen, dass die CAR-Aktivität in vivo möglicherweise durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird, wobei insbesondere die unbewusste Exposition gegenüber Nutrazeutika und lipophilen, persistierenden Umweltgiften eine große Rolle spielt (Heller 2013, Hernandez *et al.* 2009). Trotzdem die Konzentration einzelner Umweltchemikalien durch rechtliche Begrenzungen

heute häufig zu niedrig ist, um eine CAR-Aktivierung zu bewirken, könnten jahrelange Akkumulation sowie synergistische Effekte verschiedener Substanzen des uns umgebenden Chemikalien-Milieus in Summe problemlos dafür ausreichen (Hernandez *et al.* 2009, Jones und de Voogt 1999) und so interindividuelle Unterschiede im hepatischen Fremdstoffmetabolismus und ideosynkratische Reaktionen auf medikamentöse Therapien begünstigen.

Die für TCPOBOP beobachteten multigenerationalen Effekte legen darüber hinaus nahe, dass zukünftig vermehrt generationsübergreifende Untersuchungen zu Xenobiotika durchgeführt werden sollten. Während toxikologische Analysen im Tiermodell häufig generationsübergreifend angelegt werden, lassen Pharmakovigilanzstudien von Medikamenten diesen Aspekt auf Grund praktischer Schwellen und ethischer Begrenzungen bislang außer Acht (Gluckman *et al.* 2011, Mirbahai und Chipman 2014). Einen ersten Ansatz zur Überwindung dieser Schwellen lieferten Bingsohn *et al.* (2016), die die Verwendung des rotbraunen Reismehlkäfers (*Tribolium castaneum*) zur präklinischen Erforschung möglicher transgenerationaler Effekte vorschlagen; alternativ wären jedoch auch retrospektive Analysen anhand von Langzeitstudien und nationalen Gesundheitsregistern (Gluckman *et al.* 2011) oder validierte computerbasierte Modelle (Lee *et al.* 2007) vorstellbar.

Neben dem Einfluss auf bestehende pharmakotherapeutische Therapien bleibt langfristig zu klären, ob die gezielte Modulierung der Aktivität von CAR und seiner Zielgene medizinisch nutzbar sein könnte (Banerjee *et al.* 2015, Chai *et al.* 2013). Andere nukleäre Rezeptoren werden bereits heute erfolgreich als Zielstrukturen medikamentöser Therapien verwendet. So binden beispielsweise Fibrate, welche in der Behandlung von Hyperlipidämien genutzt werden, an PPAR α (Fuchs *et al.* 2016, Kandel *et al.* 2016) und Glitazone, welche zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt werden können (Fuchs *et al.* 2016), aktivieren PPAR γ . Ausgehend von den Stoffwechselwegen, an denen CAR beteiligt ist, könnten neben Osteoporose (vgl. 4.2) und metabolischen Erkrankungen wie Adipositas oder Diabetes (vgl. 4.3) insbesondere die Leber betreffende Beschwerden wie Cholestasis und Gelbsucht (vgl. 1.4; (Suino *et al.* 2004)) mögliche Indikationen einer medikamentösen CAR-modulierenden Therapie sein. Die Vielzahl der endogenen Prozesse, welche durch CAR beeinflusst werden, schränkt die Verwendung jedoch gleichzeitig massiv ein, da so auch diverse Nebenwirkungen möglich sind. Eine Modulierung von CAR müsste demnach hochgradig selektiv erfolgen und dürfte nur bestimmte Zielgene oder Organe betreffen.

4.8 Generationsübergreifende Effekte als evolutionäres Bindeglied zwischen Adaption und Akklimatisation

Wie bereits in Kapitel 4.4 angesprochen, könnten die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten generationsübergreifenden Veränderungen im Stoffwechsel möglicherweise der Anpassung der Folgegeneration an die vorherrschenden Umweltbedingungen dienen, da die neonatale Entwicklungsplastizität antizipatorische Reaktionen auf die Exposition gegenüber dem aktuellen Fremdstoffmilieu ermöglicht (Gluckman *et al.* 2011). Evolutionär betrachtet, würde sie so eine Zwischenstufe zwischen Adaptation und Akklimatisation darstellen und die Anpassung im Zeitrahmen zwischen Selektion (viele Generationen) und Homeostase (Minuten/Tage) sicherstellen (Gluckman *et al.* 2011).

Gerade bei dynamischen Umweltfaktoren mit instabilen häufig wechselnden Faktoren wie dem Fremdstoffmilieu, die massiven Einfluss auf homöostatische Balance, Gesundheit und Fortpflanzungsfähigkeit haben, würde die simultane Anpassung der transkriptionellen Aktivität aller Nachkommen einen enormen Vorteil gegenüber der genetischen Adaption bieten, welche auf Mutationen in Einzelindividuen zurückgeht und zunächst über Generationen verbreitet werden muss (Burggren 2016). Dies gilt insbesondere, da sie nicht nur eine schnelle, sondern vor allem reversible Anpassung an die Umweltbedingungen ermöglicht, wohingegen genetische Adaption und Selektion im Allgemeinen nicht umkehrbar sind und somit potentiell ins Negative umschlagen, wenn sich die äußeren Einflüsse erneut ändern (Burggren 2016, Townsend *et al.* 2003).

Gleichzeitig führt die verbesserte Anpassung an die vorherrschenden Umweltbedingungen jedoch auch zu einem erheblichen Selektions-Vorteil, weshalb es sekundär zu genetischer Adaption kommen könnte (Burggren 2016, Nilsson und Skinner 2015). Derartige evolutionäre Mechanismen sekundärer Adaption, gefördert durch primär erworbene Merkmale (Baldwin-Effekt), wurden in den vergangenen Jahren insbesondere im Zusammenhang mit Epigenetik diskutiert, da die Empfindlichkeit gegenüber genetischen Mutationen durch epigenetische Veränderungen erhöht ist (Skinner 2016). Evolutionsbiologisch würde die sekundäre Adaption, basierend auf einem Selektionsvorteil durch nicht-genetische generationsübergreifende Anpassung, eine Brücke zwischen der darwinistischen Lehre vom Überleben der am besten Angepassten (1859) und der bislang im Allgemeinen als falsch angesehenen Lamarck'schen Evolutionstheorie (1809) schlagen, welche auf der Vererbung erworbener Merkmale beruht (Handel und Ramagopalan 2010, Hughes 2014, Skinner 2015).

Literaturverzeichnis

- Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren (TierSchVersV), §2 Absatz 2, Anlage 2, Deutschland
- Ainge H., Thompson C., Ozanne S. E. und Rooney K. B. (2011) A systematic review on animal models of maternal high fat feeding and offspring glycaemic control, *Int J Obes (Lond)* 35(3), 325-335; PMID #20680016
- Aleksunes L. M. und Klaassen C. D. (2012) Coordinated regulation of hepatic phase I and II drug-metabolizing genes and transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPARalpha-, and Nrf2-null mice, *Drug Metab Dispos* 40(7), 1366-1379; PMID #22496397
- Amar M. J., Sakurai T., Sakurai-Ikuta A., Sviridov D., Freeman L., Ahsan L. und Remaley A. T. (2015) A novel apolipoprotein C-II mimetic peptide that activates lipoprotein lipase and decreases serum triglycerides in apolipoprotein E-knockout mice, *J Pharmacol Exp Ther* 352(2), 227-235; PMID #25395590
- Amore B. M., Kalthorn T. F., Skiles G. L., Hunter A. P., Bennett G. D., Finnell R. H., Nelson S. D. und Slattery J. T. (1997) Characterization of carbamazepine metabolism in a mouse model of carbamazepine teratogenicity, *Drug Metab Dispos* 25(8), 953-962; PMID #9280403
- Anblagan D., Deshpande R., Jones N. W., Costigan C., Bugg G., Raine-Fenning N., Gowland P. A. und Mansell P. (2013) Measurement of fetal fat in utero in normal and diabetic pregnancies using magnetic resonance imaging, *Ultrasound Obstet Gynecol* 42(3), 335-340; PMID #23288811
- Andrade S. E., Gurwitz J. H., Davis R. L., Chan K. A., Finkelstein J. A., Fortman K., McPhillips H., Raebel M. A., Roblin D., Smith D. H., Yood M. U., Morse A. N. und Platt R. (2004) Prescription drug use in pregnancy, *Am J Obstet Gynecol* 191(2), 398-407; PMID #15343213
- Anwar M. J., Radhakrishna K. V., Sharma A. und Vohora D. (2014a) Raloxifene preserves phenytoin and sodium valproate induced bone loss by modulating serum estradiol and TGF-beta3 content in bone of female mice, *Eur J Pharm Sci* 62 219-226; PMID #24880111
- Anwar M. J., Radhakrishna K. V. und Vohora D. (2014b) Phenytoin and sodium valproate but not levetiracetam induce bone alterations in female mice, *Can J Physiol Pharmacol* 92(6), 507-511; PMID #24761981
- Anway M. D., Cupp A. S., Uzumcu M. und Skinner M. K. (2005) Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility, *Science* 308(5727), 1466-1469; PMID #15933200
- Arnold K. A., Eichelbaum M. und Burk O. (2004) Alternative splicing affects the function and tissue-specific expression of the human constitutive androstane receptor, *Nucl Recept* 2(1), 1; PMID #15043764
- Ashauer R., Hintermeister A., O'connor I., Elumelu M., Hollender J. und Escher B. I. (2012) Significance of xenobiotic metabolism for bioaccumulation kinetics of organic chemicals in *Gammarus pulex*, *Environ Sci Technol* 46(6), 3498-3508; PMID #22321051
- Auerbach S. S., Ramsden R., Stoner M. A., Verlinde C., Hassett C. und Omiecinski C. J. (2003) Alternatively spliced isoforms of the human constitutive androstane receptor, *Nucleic Acids Res* 31(12), 3194-3207; PMID #12799447
- Ayala J. E., Samuel V. T., Morton G. J., Obici S., Croniger C. M., Shulman G. I., Wasserman D. H., Mcguinness O. P. und Consortium N. I. H. M. P. C. (2010) Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice, *Dis Model Mech* 3(9-10), 525-534; PMID #20713647
- Azrolan N., Odaka H., Breslow J. L. und Fisher E. A. (1995) Dietary fat elevates hepatic apoA-I production by increasing the fraction of apolipoprotein A-I mRNA in the translating pool, *J Biol Chem* 270(34), 19833-19838; PMID #7649994
- Azuma K., Casey S. C., Ito M., Urano T., Horie K., Ouchi Y., Kirchner S., Blumberg B. und Inoue S. (2010) Pregnane X receptor knockout mice display osteopenia with reduced bone formation and enhanced bone resorption, *J Endocrinol* 207(3), 257-263; PMID #20876238

- Azuma K., Casey S. C., Urano T., Horie-Inoue K., Ouchi Y., Blumberg B. und Inoue S. (2015) Pregnane X receptor knockout mice display aging-dependent wearing of articular cartilage, *PLoS One* 10(3), e0119177; PMID #25749104
- Baes M., Gulick T., Choi H. S., Martinoli M. G., Simha D. und Moore D. D. (1994) A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements, *Mol Cell Biol* 14(3), 1544-1552; PMID #8114692
- Bajrami E. und Spiroski M. (2016) Genomic Imprinting, *Open Access Maced J Med Sci* 4(1), 181-184; PMID #27275355
- Baker T. R., King-Heiden T. C., Peterson R. E. und Heideman W. (2014) Dioxin induction of transgenerational inheritance of disease in zebrafish, *Mol Cell Endocrinol* 398(1-2), 36-41; PMID #25194296
- Banerjee M., Robbins D. und Chen T. (2015) Targeting xenobiotic receptors PXR and CAR in human diseases, *Drug Discov Today* 20(5), 618-628; PMID #25463033
- Bar-Oz B., Bulkowstein M., Benyamini L., Greenberg R., Soriano I., Zimmerman D., Bortnik O. und Berkovitch M. (2003) Use of antibiotic and analgesic drugs during lactation, *Drug Saf* 26(13), 925-935; PMID #14583068
- Bar-Oz B., Nulman I., Koren G. und Ito S. (2000) Anticonvulsants and breast feeding: a critical review, *Paediatr Drugs* 2(2), 113-126; PMID #10937463
- Bartha A. I., Shen J., Katz K. H., Mischel R. E., Yap K. R., Ivacko J. A., Andrews E. M., Ferriero D. M., Ment L. R. und Silverstein F. S. (2007) Neonatal seizures: multicenter variability in current treatment practices, *Pediatr Neurol* 37(2), 85-90; PMID #17675022
- Beierle I., Meibohm B. und Derendorf H. (1999) Gender differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics, *Int J Clin Pharmacol Ther* 37(11), 529-547; PMID #10584975
- Bingsohn L., Knorr E. und Vilcinskis A. (2016) The model beetle *Tribolium castaneum* can be used as an early warning system for transgenerational epigenetic side effects caused by pharmaceuticals, *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 185-186 57-64; PMID #26972758
- Blake G. E. und Watson E. D. (2016) Unravelling the complex mechanisms of transgenerational epigenetic inheritance, *Curr Opin Chem Biol* 33 101-107; PMID #27327212
- Blanco-Bose W. E., Murphy M. J., Ehninger A., Offner S., Dubey C., Huang W., Moore D. D. und Trumpp A. (2008) C-Myc and its target FoxM1 are critical downstream effectors of constitutive androstane receptor (CAR) mediated direct liver hyperplasia, *Hepatology* 48(4), 1302-1311; PMID #18798339
- Blizard D., Sueyoshi T., Negishi M., Dehal S. S. und Kupfer D. (2001) Mechanism of induction of cytochrome p450 enzymes by the proestrogenic endocrine disruptor pesticide-methoxychlor: interactions of methoxychlor metabolites with the constitutive androstane receptor system, *Drug Metab Dispos* 29(6), 781-785; PMID #11353743
- Boney C. M., Verma A., Tucker R. und Vohr B. R. (2005) Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus, *Pediatrics* 115(3), e290-296; PMID #15741354
- Boussadia B., Gangarossa G., Mselli-Lakhal L., Rousset M. C., De Bock F., Lassere F., Ghosh C., Pascussi J. M., Janigro D. und Marchi N. (2016) Lack of CAR impacts neuronal function and cerebrovascular integrity in vivo, *Exp Neurol* 283(Pt A), 39-48; PMID #27240521
- Braeuning A., Gavrilov A., Brown S., Wolf C. R., Henderson C. J. und Schwarz M. (2014) Phenobarbital-mediated tumor promotion in transgenic mice with humanized CAR and PXR, *Toxicol Sci* 140(2), 259-270; PMID #24863967
- Brieno-Enriquez M. A., Garcia-Lopez J., Cardenas D. B., Guibert S., Cleroux E., Ded L., Hourcade Jde D., Peknicova J., Weber M. und Del Mazo J. (2015) Exposure to endocrine disruptor induces transgenerational epigenetic deregulation of microRNAs in primordial germ cells, *PLoS One* 10(4), e0124296; PMID #25897752
- Bright A. S., Herrera-Garcia G., Moscovitz J. E., You D., Guo G. L. und Aleksunes L. M. (2016) Regulation of Drug Disposition Gene Expression in Pregnant Mice with Car Receptor Activation, *Nucl Receptor Res* 3 PMID #27818994

- Bromfield J. J., Schjenken J. E., Chin P. Y., Care A. S., Jasper M. J. und Robertson S. A. (2014) Maternal tract factors contribute to paternal seminal fluid impact on metabolic phenotype in offspring, *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(6), 2200-2205; PMID #24469827
- Brown J. P., Delmas P. D., Malaval L., Edouard C., Chapuy M. C. und Meunier P. J. (1984) Serum bone Gla-protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis, *Lancet* 1(8386), 1091-1093; PMID #6144827
- Bruggeman W. A., Opperhuizen A., Wijbenga A. und Hutzinger O. (1984) Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, *Toxicological & Environmental Chemistry* 7(3), 173-189; PMID
- Buajordet I., Ebbesen J., Erikssen J., Brors O. und Hilberg T. (2001) Fatal adverse drug events: the paradox of drug treatment, *J Intern Med* 250(4), 327-341; PMID #11576320
- Buratti F. M., De Angelis G., Ricceri L., Venerosi A., Calamandrei G. und Testai E. (2011) Foetal and neonatal exposure to chlorpyrifos: biochemical and metabolic alterations in the mouse liver at different developmental stages, *Toxicology* 280(3), 98-108; PMID #21129432
- Burger J., Kirchner M., Bramanti B., Haak W. und Thomas M. G. (2007) Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(10), 3736-3741; PMID #17360422
- Burger P. C. und Herdson P. B. (1966) Phenobarbital-induced fine structural changes in rat liver, *Am J Pathol* 48(5), 793-809; PMID #5937778
- Burggren W. (2016) Epigenetic Inheritance and Its Role in Evolutionary Biology: Re-Evaluation and New Perspectives, *Biology (Basel)* 5(2), PMID #27231949
- Caligioni C. S. (2009) Assessing reproductive status/stages in mice, *Curr Protoc Neurosci* Appendix 4 Appendix 4I; PMID #19575469
- Canistro D., Bonamassa B., Pozzetti L., Sapone A., Abdel-Rahman S. Z., Biagi G. L. und Paolini M. (2009) Alteration of xenobiotic metabolizing enzymes by resveratrol in liver and lung of CD1 mice, *Food Chem Toxicol* 47(2), 454-461; PMID #19101601
- Cantelli-Forti G. und Camerino A. (1998) Testosterone hydroxylase as multibiomarker of effect in evaluating vinclozolin cocarcinogenesis, *Biomarkers* 3(3), 191-203; PMID #23899330
- Cascorbi I. (2012) Drug interactions--principles, examples and clinical consequences, *Dtsch Arztebl Int* 109(33-34), 546-555; quiz 556; PMID #23152742
- Chai S. C., Cherian M. T., Wang Y. M. und Chen T. (2016) Small-molecule modulators of PXR and CAR, *Biochim Biophys Acta* 1859(9), 1141-1154; PMID #26921498
- Chai X., Zeng S. und Xie W. (2013) Nuclear receptors PXR and CAR: implications for drug metabolism regulation, pharmacogenomics and beyond, *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 9(3), 253-266; PMID #23327618
- Chang T. K. und Waxman D. J. (2006) Synthetic drugs and natural products as modulators of constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR), *Drug Metab Rev* 38(1-2), 51-73; PMID #16684648
- Chen W. D., Fu X., Dong B., Wang Y. D., Shiah S., Moore D. D. und Huang W. (2012) Neonatal activation of the nuclear receptor CAR results in epigenetic memory and permanent change of drug metabolism in mouse liver, *Hepatology* 56(4), 1499-1509; PMID #22488010
- Cheng X., Maher J., Dieter M. Z. und Klaassen C. D. (2005) Regulation of mouse organic anion-transporting polypeptides (Oatps) in liver by prototypical microsomal enzyme inducers that activate distinct transcription factor pathways, *Drug Metab Dispos* 33(9), 1276-1282; PMID #15919853
- Cho H. Y., Jung J. Y., Park H., Yang J. Y., Jung S., An J. H., Cho S. W., Kim S. W., Kim S. Y., Kim J. E., Park Y. J. und Shin C. S. (2014) In vivo deletion of CAR resulted in high bone mass phenotypes in male mice, *J Cell Physiol* 229(5), 561-571; PMID #24114688
- Choi E., Lee S., Yeom S. Y., Kim G. H., Lee J. W. und Kim S. W. (2005) Characterization of activating signal cointegrator-2 as a novel transcriptional coactivator of the xenobiotic nuclear receptor constitutive androstane receptor, *Mol Endocrinol* 19(7), 1711-1719; PMID #15764585
- Choi H. S., Chung M., Tzamelis I., Simha D., Lee Y. K., Seol W. und Moore D. D. (1997) Differential transactivation by two isoforms of the orphan nuclear hormone receptor CAR, *J Biol Chem* 272(38), 23565-23571; PMID #9295294

- Christensen B. C., Houseman E. A., Marsit C. J., Zheng S., Wrensch M. R., Wiemels J. L., Nelson H. H., Karagas M. R., Padbury J. F., Bueno R., Sugarbaker D. J., Yeh R. F., Wiencke J. K. und Kelsey K. T. (2009) Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context, *PLoS Genet* 5(8), e1000602; PMID #19680444
- Clarke B. (2008) Normal bone anatomy and physiology, *Clin J Am Soc Nephrol* 3 Suppl 3 S131-139; PMID #18988698
- Cui J. Y. und Klaassen C. D. (2016) RNA-Seq reveals common and unique PXR- and CAR-target gene signatures in the mouse liver transcriptome, *Biochim Biophys Acta* 1859(9), 1198-1217; PMID #27113289
- Cummings S. R. und Melton L. J. (2002) Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures, *Lancet* 359(9319), 1761-1767; PMID #12049882
- Daly A. K. (2006) Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms, *Clin Pharmacokinet* 45(1), 13-31; PMID #16430309
- Dartnell J. G., Anderson R. P., Chohan V., Galbraith K. J., Lyon M. E., Nestor P. J. und Moulds R. F. (1996) Hospitalisation for adverse events related to drug therapy: incidence, avoidability and costs, *Med J Aust* 164(11), 659-662; PMID #8657028
- Dass B., Tardif S., Park J. Y., Tian B., Weitlauf H. M., Hess R. A., Carnes K., Griswold M. D., Small C. L. und Macdonald C. C. (2007) Loss of polyadenylation protein tauCstF-64 causes spermatogenic defects and male infertility, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(51), 20374-20379; PMID #18077340
- Davanzo R., Dal Bo S., Bua J., Copertino M., Zanelli E. und Matarazzo L. (2013) Antiepileptic drugs and breastfeeding, *Ital J Pediatr* 39 50; PMID #23985170
- Daxinger L. und Whitelaw E. (2012) Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals, *Nat Rev Genet* 13(3), 153-162; PMID #22290458
- Day J., Savani S., Krempley B. D., Nguyen M. und Kitlinska J. B. (2016) Influence of paternal preconception exposures on their offspring: through epigenetics to phenotype, *Am J Stem Cells* 5(1), 11-18; PMID #27335698
- Deichmann W. B., Macdonald W. E. und Cubit D. A. (1975) Dieldrin and DDT in the tissues of mice fed aldrin and DDT for seven generations, *Arch Toxicol* 34(3), 173-182; PMID #1243618
- Dekeyser J. G., Laurenzana E. M., Peterson E. C., Chen T. und Omiecinski C. J. (2011) Selective phthalate activation of naturally occurring human constitutive androstane receptor splice variants and the pregnane X receptor, *Toxicol Sci* 120(2), 381-391; PMID #21227907
- Demant T. (2009), Laboruntersuchungen im Institut für Klinische Chemie und Labormedizin (IKL), [zitiert am 11.08.2016], <http://docplayer.org/13179762-Laboruntersuchungen-im-institut-fuer-klinische-chemie-und-labormedizin-ikl.html>
- Di Consiglio E., De Angelis G., Traina M. E., Urbani E. und Testai E. (2009) Effect of lindane on CYP-mediated steroid hormone metabolism in male mice following in utero exposure, *J Appl Toxicol* 29(8), 648-655; PMID #19557771
- Di Masi A., De Marinis E., Ascenzi P. und Marino M. (2009) Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects, *Mol Aspects Med* 30(5), 297-343; PMID #19427329
- Dias B. G. und Ressler K. J. (2014) Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations, *Nat Neurosci* 17(1), 89-96; PMID #24292232
- Ding X., Lichti K., Kim I., Gonzalez F. J. und Staudinger J. L. (2006) Regulation of constitutive androstane receptor and its target genes by fasting, cAMP, hepatocyte nuclear factor alpha, and the coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha, *J Biol Chem* 281(36), 26540-26551; PMID #16825189
- Dong B., Qatanani M. und Moore D. D. (2009a) Constitutive androstane receptor mediates the induction of drug metabolism in mouse models of type 1 diabetes, *Hepatology* 50(2), 622-629; PMID #19489075
- Dong B., Saha P. K., Huang W., Chen W., Abu-Elheiga L. A., Wakil S. J., Stevens R. D., Ilkayeva O., Newgard C. B., Chan L. und Moore D. D. (2009b) Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(44), 18831-18836; PMID #19850873

- Donovan M. D., Griffin B. T., Kharoshankaya L., Cryan J. F. und Boylan G. B. (2016) Pharmacotherapy for Neonatal Seizures: Current Knowledge and Future Perspectives, *Drugs* 76(6), 647-661; PMID #26943929
- Doring B. und Petzinger E. (2014) Phase 0 and phase III transport in various organs: combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism, *Drug Metab Rev* 46(3), 261-282; PMID #24483608
- Drake M. T. und Khosla S. (2012) Male osteoporosis, *Endocrinol Metab Clin North Am* 41(3), 629-641; PMID #22877433
- Eckert R., Randall D., Apfelbach R. und Gansloßer U., *Tierphysiologie [jetzt mit Glossar] ; 55 Tabellen.* (4., durchges. Aufl.). Thieme, Stuttgart [u.a.] (2002)
- Egger G., Liang G., Aparicio A. und Jones P. A. (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy, *Nature* 429(6990), 457-463; PMID #15164071
- Eichelbaum M. (2013) [Pharmacogenetics: current state after 30 years of research], *Dtsch Med Wochenschr* 138(13), 659-661; PMID #23512369
- EMA-Beschluss: Protelos/Osseor bleibt unter weiteren Beschränkungen im Verkehr [Internet]; 15.04.2014 [zitiert am 01.09.2016]; European Medicines Agency, London; http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/Referrals_document/Protelos_and_Osseor/European_Commission_final_decision/WC500173033.pdf; EMA/235924/2014
- Ernst E. (1999) Second thoughts about safety of St John's wort, *Lancet* 354(9195), 2014-2016; PMID #10636361
- Estabrook R. W. (2003) A passion for P450s (remembrances of the early history of research on cytochrome P450), *Drug Metab Dispos* 31(12), 1461-1473; PMID #14625342
- Fachinformation Forsteo 20ug/80ul Injektionslösung [Internet]; Stand: Januar 2016 [zitiert am 01.09.2016]; Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg; Zulassungsnummern: EU/1/03/247/001 - 002; https://www.lilly-pharma.de/de/pdf/fachinformation/fachinformation_forsteo.pdf
- Fachinformation MSD Zocor 5mg/10mg/20mg und Zocor Forte 40mg/80mg [Internet]; Stand: April 2017 [zitiert am 06.08.2017]; MSD SHARP & DOHME GMBH, Haar; Zulassungsnummern: 35406.00.00 - 35406.04.00; <https://www.msd.de/fileadmin/files/fachinformationen/zocor.pdf>
- Fachinformation Protelos Servier 2g [Internet]; Stand: Juni 2014 [zitiert am 01.09.2016]; Servier Deutschland GmbH, München; Zulassungsnummern: EU/1/04/288/001 - 006; <https://www.fachinfo.de/pdf/008621>
- Fazzalari N. L. (2011) Bone fracture and bone fracture repair, *Osteoporos Int* 22(6), 2003-2006; PMID #21523400
- Ferm V. H. und Carpenter S. J. (1967) Developmental malformations resulting from the administration of lead salts, *Exp Mol Pathol* 7(2), 208-213; PMID #6053651
- Fitzpatrick L. A. (2004) Pathophysiology of bone loss in patients receiving anticonvulsant therapy, *Epilepsy Behav* 5 Suppl 2 S3-15; PMID #15123006
- Flexner C. (2000) Dual protease inhibitor therapy in HIV-infected patients: pharmacologic rationale and clinical benefits, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40 649-674; PMID #10836150
- Forman B. M., Tzamelis I., Choi H. S., Chen J., Simha D., Seol W., Evans R. M. und Moore D. D. (1998) Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta, *Nature* 395(6702), 612-615; PMID #9783588
- Forti N. und Diament J. (2006) High-density lipoproteins: metabolic, clinical, epidemiological and therapeutic intervention aspects. An update for clinicians, *Arq Bras Cardiol* 87(5), 671-679; PMID #17221046
- Francis D. D., Szegda K., Campbell G., Martin W. D. und Insel T. R. (2003) Epigenetic sources of behavioral differences in mice, *Nat Neurosci* 6(5), 445-446; PMID #12665797
- Fuchs C. D., Traussnigg S. A. und Trauner M. (2016) Nuclear Receptor Modulation for the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease, *Semin Liver Dis* 36(1), 69-86; PMID #26870934
- Gallenberg L. A., Ring B. J. und Vodicknik M. J. (1990) The influence of time of maternal exposure to 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl on its accumulation in their nursing offspring, *Toxicol Appl Pharmacol* 104(1), 1-8; PMID #2113719

- Gallenberg L. A. und Vodcink M. J. (1987) Potential mechanisms for redistribution of polychlorinated biphenyls during pregnancy and lactation, *Xenobiotica* 17(3), 299-310; PMID #3107224
- Gallou-Kabani C., Vige A. und Junien C. (2007) Lifelong circadian and epigenetic drifts in metabolic syndrome, *Epigenetics* 2(3), 137-146; PMID #17965598
- Gao J., He J., Zhai Y., Wada T. und Xie W. (2009) The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity, *J Biol Chem* 284(38), 25984-25992; PMID #19617349
- Gao J. und Xie W. (2010) Pregnane X receptor and constitutive androstane receptor at the crossroads of drug metabolism and energy metabolism, *Drug Metab Dispos* 38(12), 2091-2095; PMID #20736325
- Gaylord Chemical Company L. L. C. (2014), Bulletin 106 - Dimethyl Sulfoxide Health and Safety information, Bulletin, [zitiert am 24.07.2014], <http://www.gaylordchemical.com/products/literature/dms0-health-safety/>
- Gerich J. E., Meyer C., Woerle H. J. und Stumvoll M. (2001) Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis, *Diabetes Care* 24(2), 382-391; PMID #11213896
- Germain P. und Bourguet W. (2013) Dimerization of nuclear receptors, *Methods Cell Biol* 117 21-41; PMID #24143970
- Gluckman P. D., Low F. M., Buklijas T., Hanson M. A. und Beedle A. S. (2011) How evolutionary principles improve the understanding of human health and disease, *Evol Appl* 4(2), 249-263; PMID #25567971
- Gnerre C., Schuster G. U., Roth A., Handschin C., Johansson L., Looser R., Parini P., Podvinec M., Robertsson K., Gustafsson J. A. und Meyer U. A. (2005) LXR deficiency and cholesterol feeding affect the expression and phenobarbital-mediated induction of cytochromes P450 in mouse liver, *J Lipid Res* 46(8), 1633-1642; PMID #15930522
- Grieco A., Forgione A., Miele L., Vero V., Greco A. V., Gasbarrini A. und Gasbarrini G. (2005) Fatty liver and drugs, *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 9(5), 261-263; PMID #16237810
- Griffin C., Lanzetta N., Eter L. und Singer K. (2016) Sexually dimorphic myeloid inflammatory and metabolic responses to diet-induced obesity, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 311(2), R211-216; PMID #27252473
- Griffiths A. J. F., *Introduction to genetic analysis*. (9.). Freeman, New York, NY [Basingstoke] (2008)
- Gundberg C. M., Clough M. E. und Carpenter T. O. (1992) Development and validation of a radioimmunoassay for mouse osteocalcin: paradoxical response in the Hyp mouse, *Endocrinology* 130(4), 1909-1915; PMID #1547718
- Guo Y., Lu P., Farrell E., Zhang X., Weller P., Monshouwer M., Wang J., Liao G., Zhang Z., Hu S., Allard J., Shafer S., Usuka J. und Peltz G. (2007) In silico and in vitro pharmacogenetic analysis in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(45), 17735-17740; PMID #17978195
- Gupta A. und March L. (2016) Treating osteoporosis, *Aust Prescr* 39(2), 40-46; PMID #27340321
- Han T., Zhang D., Fu Z., Sun Y., Yang W. und Yuan C. (2013) Retinol-binding protein 4 as a risk factor for cholesterol gallstone formation, *Mol Cell Biochem* 377(1-2), 219-227; PMID #23420326
- Handel A. E. und Ramagopalan S. V. (2010) Is Lamarckian evolution relevant to medicine?, *BMC Med Genet* 11 73; PMID #20465829
- Handlungsleitlinie Fettstoffwechselstörungen aus Empfehlungen zur Therapie von Fettstoffwechselstörungen (3. Auflage) [Internet]; 2012 [zitiert am 02.10.2016]; Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (Akdäe), Berlin; https://www.akdae.de/Arzneimitteltherapie/TE/A-Z/PDF_Kurzversion/Fettstoffwechselstoerungen_k.pdf; Band 39 Sonderheft 1
- Handschin C. und Meyer U. A. (2003) Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors, *Pharmacol Rev* 55(4), 649-673; PMID #14657421
- Hanley D. A., Adachi J. D., Bell A. und Brown V. (2012) Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes, *Int J Clin Pract* 66(12), 1139-1146; PMID #22967310
- Hayhurst G. P., Lee Y. H., Lambert G., Ward J. M. und Gonzalez F. J. (2001) Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis, *Mol Cell Biol* 21(4), 1393-1403; PMID #11158324

- Hedrich W. D., Hassan H. E. und Wang H. (2016) Insights into CYP2B6-mediated drug-drug interactions, *Acta Pharm Sin B* 6(5), 413-425; PMID #27709010
- Heller F. (2013) Genetics/genomics and drug effects, *Acta Clin Belg* 68(2), 77-80; PMID #23967712
- Henderson L., Yue Q. Y., Bergquist C., Gerden B. und Arlett P. (2002) St John's wort (*Hypericum perforatum*): drug interactions and clinical outcomes, *Br J Clin Pharmacol* 54(4), 349-356; PMID #12392581
- Hernandez C. J., Majeska R. J. und Schaffler M. B. (2004) Osteocyte density in woven bone, *Bone* 35(5), 1095-1099; PMID #15542034
- Hernandez J. P., Mota L. C. und Baldwin W. S. (2009) Activation of CAR and PXR by Dietary, Environmental and Occupational Chemicals Alters Drug Metabolism, Intermediary Metabolism, and Cell Proliferation, *Curr Pharmacogenomics Person Med* 7(2), 81-105; PMID #20871735
- Heydemann A. (2016) An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus, *J Diabetes Res* 2016 2902351; PMID #27547764
- Ho D. H. und Burggren W. W. (2010) Epigenetics and transgenerational transfer: a physiological perspective, *J Exp Biol* 213(1), 3-16; PMID #20008356
- Hoffmann J. M. und Partridge L. (2015) Nuclear hormone receptors: Roles of xenobiotic detoxification and sterol homeostasis in healthy aging, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 50(5), 380-392; PMID #26383043
- Holland M. L. und Rakyan V. K. (2013) Transgenerational inheritance of non-genetically determined phenotypes, *Biochem Soc Trans* 41(3), 769-776; PMID #23697936
- Honkakoski P. und Negishi M. (1997) Characterization of a phenobarbital-responsive enhancer module in mouse P450 Cyp2b10 gene, *J Biol Chem* 272(23), 14943-14949; PMID #9169466
- Honkakoski P., Sueyoshi T. und Negishi M. (2003) Drug-activated nuclear receptors CAR and PXR, *Ann Med* 35(3), 172-182; PMID #12822739
- Honkakoski P., Zelko I., Sueyoshi T. und Negishi M. (1998) The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene, *Mol Cell Biol* 18(10), 5652-5658; PMID #9742082
- Hosseinpour F., Moore R., Negishi M. und Sueyoshi T. (2006) Serine 202 regulates the nuclear translocation of constitutive active/androstane receptor, *Mol Pharmacol* 69(4), 1095-1102; PMID #16377764
- Hotham N. und Hotham E. (2015) Drugs in breastfeeding, *Aust Prescr* 38(5), 156-159; PMID #26648652
- Hrelia P., Fimognari C., Maffei F., Vigagni F., Mesirca R., Pozzetti L., Paolini M. und Cantelli Forti G. (1996) The genetic and non-genetic toxicity of the fungicide Vinclozolin, *Mutagenesis* 11(5), 445-453; PMID #8921505
- Huang W., Zhang J., Chua S. S., Qatanani M., Han Y., Granata R. und Moore D. D. (2003) Induction of bilirubin clearance by the constitutive androstane receptor (CAR), *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7), 4156-4161; PMID #12644704
- Hughes V. (2014) Epigenetics: The sins of the father, *Nature* 507(7490), 22-24; PMID #24598623
- Inoue K., Borchers C. H. und Negishi M. (2006) Cohesin protein SMC1 represses the nuclear receptor CAR-mediated synergistic activation of a human P450 gene by xenobiotics, *Biochem J* 398(1), 125-133; PMID #16623664
- Ishikawa T. (1992) The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump, *Trends Biochem Sci* 17(11), 463-468; PMID #1455517
- Iwatani M., Ikegami K., Kremenska Y., Hattori N., Tanaka S., Yagi S. und Shiota K. (2006) Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body, *Stem Cells* 24(11), 2549-2556; PMID #16840553
- Jackson J. P., Ferguson S. S., Moore R., Negishi M. und Goldstein J. A. (2004) The constitutive active/androstane receptor regulates phenytoin induction of Cyp2c29, *Mol Pharmacol* 65(6), 1397-1404; PMID #15155833
- Jackson J. P., Ferguson S. S., Negishi M. und Goldstein J. A. (2006) Phenytoin induction of the cyp2c37 gene is mediated by the constitutive androstane receptor, *Drug Metab Dispos* 34(12), 2003-2010; PMID #16936065

- Jarukamjorn K., Sakuma T., Jaruchotikamol A., Ishino Y., Oguro M. und Nemoto N. (2006) Modified expression of cytochrome P450 mRNAs by growth hormone in mouse liver, *Toxicology* 219(1-3), 97-105; PMID #16377053
- Jarukamjorn K., Sakuma T., Miyaura J. und Nemoto N. (1999) Different regulation of the expression of mouse hepatic cytochrome P450 2B enzymes by glucocorticoid and phenobarbital, *Arch Biochem Biophys* 369(1), 89-99; PMID #10462443
- Jimenez-Chillaron J. C., Isganaitis E., Charalambous M., Gesta S., Pentinat-Pelegrin T., Faucette R. R., Otis J. P., Chow A., Diaz R., Ferguson-Smith A. und Patti M. E. (2009) Intergenerational transmission of glucose intolerance and obesity by in utero undernutrition in mice, *Diabetes* 58(2), 460-468; PMID #19017762
- Jinno H., Tanaka-Kagawa T., Hanioka N., Ishida S., Saeki M., Soyama A., Itoda M., Nishimura T., Saito Y., Ozawa S., Ando M. und Sawada J. (2004) Identification of novel alternative splice variants of human constitutive androstane receptor and characterization of their expression in the liver, *Mol Pharmacol* 65(3), 496-502; PMID #14978227
- Jobling M. A., Hurles M. und Tyler-Smith C., *Human evolutionary genetics origins, peoples & disease*. Garland, New York [u.a.] (2004)
- Jones K. C. und De Voogt P. (1999) Persistent organic pollutants (POPs): state of the science, *Environ Pollut* 100(1-3), 209-221; PMID #15093119
- Kacevska M., Ivanov M. und Ingelman-Sundberg M. (2011) Perspectives on epigenetics and its relevance to adverse drug reactions, *Clin Pharmacol Ther* 89(6), 902-907; PMID #21508940
- Kale-Cekinmez E., Mutlu B., Yapicioglu H., Ozlu F., Asker H., Mert K., Narli N. und Satar M. (2012) Two newborns of heroin-addicted mothers suffering neonatal withdrawal syndrome, *Turk J Pediatr* 54(4), 421-424; PMID #23692726
- Kalfa N., Paris F., Philibert P., Orsini M., Broussous S., Fauconnet-Servant N., Audran F., Gaspari L., Lehors H., Haddad M., Guys J. M., Reynaud R., Alessandrini P., Merrot T., Wagner K., Kurzenne J. Y., Bastiani F., Breaud J., Valla J. S., Lacombe G. M., Dobremez E., Zahhaf A., Daures J. P. und Sultan C. (2015) Is Hypospadias Associated with Prenatal Exposure to Endocrine Disruptors? A French Collaborative Controlled Study of a Cohort of 300 Consecutive Children Without Genetic Defect, *Eur Urol* 68(6), 1023-1030; PMID #26007639
- Kandel B. A., Thomas M., Winter S., Damm G., Seehofer D., Burk O., Schwab M. und Zanger U. M. (2016) Genomewide comparison of the inducible transcriptomes of nuclear receptors CAR, PXR and PPARalpha in primary human hepatocytes, *Biochim Biophys Acta* 1859(9), 1218-1227; PMID #26994748
- Karsenty G. und Ferron M. (2012) The contribution of bone to whole-organism physiology, *Nature* 481(7381), 314-320; PMID #22258610
- Kawamoto T., Sueyoshi T., Zelko I., Moore R., Washburn K. und Negishi M. (1999) Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene, *Mol Cell Biol* 19(9), 6318-6322; PMID #10454578
- Khanna S., Pillai K. K. und Vohora D. (2009) Insights into liaison between antiepileptic drugs and bone, *Drug Discov Today* 14(7-8), 428-435; PMID #19187798
- Klaassen C. D., Casarett L. J. und Doull J. Casarett and Doull's toxicology the basic science of poisons. (2013).
- Kobayashi K., Hashimoto M., Honkakoski P. und Negishi M. (2015) Regulation of gene expression by CAR: an update, *Arch Toxicol* 89(7), 1045-1055; PMID #25975989
- Kobayashi K., Sueyoshi T., Inoue K., Moore R. und Negishi M. (2003) Cytoplasmic accumulation of the nuclear receptor CAR by a tetratricopeptide repeat protein in HepG2 cells, *Mol Pharmacol* 64(5), 1069-1075; PMID #14573755
- Koch I., Weil R., Wolbold R., Brockmoller J., Hustert E., Burk O., Nuessler A., Neuhaus P., Eichelbaum M., Zanger U. und Wojnowski L. (2002) Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA, *Drug Metab Dispos* 30(10), 1108-1114; PMID #12228187

- Kodama S., Koike C., Negishi M. und Yamamoto Y. (2004) Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes, *Mol Cell Biol* 24(18), 7931-7940; PMID #15340055
- Kohle C. und Bock K. W. (2009) Coordinate regulation of human drug-metabolizing enzymes, and conjugate transporters by the Ah receptor, pregnane X receptor and constitutive androstane receptor, *Biochem Pharmacol* 77(4), 689-699; PMID #18606396
- Kohle C., Schwarz M. und Bock K. W. (2008) Promotion of hepatocarcinogenesis in humans and animal models, *Arch Toxicol* 82(9), 623-631; PMID #18204979
- Kondo E., Yasoda A., Fujii T., Nakao K., Yamashita Y., Ueda-Sakane Y., Kanamoto N., Miura M., Arai H., Mukoyama M., Inagaki N. und Nakao K. (2015) Increased Bone Turnover and Possible Accelerated Fracture Healing in a Murine Model With an Increased Circulating C-Type Natriuretic Peptide, *Endocrinology* 156(7), 2518-2529; PMID #25860030
- Kuhnz W., Koch S., Helge H. und Nau H. (1988) Primidone and phenobarbital during lactation period in epileptic women: total and free drug serum levels in the nursed infants and their effects on neonatal behavior, *Dev Pharmacol Ther* 11(3), 147-154; PMID #3383727
- Lahtela J. T., Arranto A. J. und Sotaniemi E. A. (1985) Enzyme inducers improve insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetic subjects, *Diabetes* 34(9), 911-916; PMID #3896900
- Lavrovsky Y., Song C. S., Chatterjee B. und Roy A. K. (1998) A rapid and reliable PCR-based assay for gene transmission and sex determination in newborn transgenic mice, *Transgenic Res* 7(4), 319-320; PMID #9859220
- Lazarou J., Pomeranz B. H. und Corey P. N. (1998) Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies, *JAMA* 279(15), 1200-1205; PMID #9555760
- Ledda-Columbano G. M., Pibiri M., Concas D., Molotzu F., Simbula G., Cossu C. und Columbano A. (2003) Sex difference in the proliferative response of mouse hepatocytes to treatment with the CAR ligand, TCPOBOP, *Carcinogenesis* 24(6), 1059-1065; PMID #12807759
- Lederman S. A. (2004) Influence of lactation on body weight regulation, *Nutr Rev* 62(7 Pt 2), S112-119; PMID #15387476
- Lee J. und Vasikaran S. (2012) Current recommendations for laboratory testing and use of bone turnover markers in management of osteoporosis, *Ann Lab Med* 32(2), 105-112; PMID #22389876
- Lee R. H., Lyles K. W. und Colon-Emeric C. (2010) A review of the effect of anticonvulsant medications on bone mineral density and fracture risk, *Am J Geriatr Pharmacother* 8(1), 34-46; PMID #20226391
- Lee S., Joo H., Kim C. T., Kim I. H. und Kim Y. (2012) High hydrostatic pressure extract of garlic increases the HDL cholesterol level via up-regulation of apolipoprotein A-I gene expression in rats fed a high-fat diet, *Lipids Health Dis* 11 77; PMID #22713542
- Lee S. K., Ou Y. C., Andersen M. E. und Yang R. S. (2007) A physiologically based pharmacokinetic model for lactational transfer of PCB 153 with or without PCB 126 in mice, *Arch Toxicol* 81(2), 101-111; PMID #16858609
- Legroux-Gerot I., Vignau J., Collier F. und Cortet B. (2005) Bone loss associated with anorexia nervosa, *Joint Bone Spine* 72(6), 489-495; PMID #16242373
- Leidig-Bruckner G. und Ziegler R. (2001) Diabetes mellitus a risk for osteoporosis?, *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109 Suppl 2 S493-514; PMID #11460594
- Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Prävention und Therapie der Adipositas [Internet]; 2014 [zitiert am 02.10.2016]; Deutsche Adipositas-Gesellschaft (DAG) e.V., Martinsried; http://www.adipositas-gesellschaft.de/fileadmin/PDF/Leitlinien/S3_Adipositas_Praevention_Therapie_2014.pdf; Version 2.0
- Nationale Versorgungsleitlinie - Therapie des Typ-2-Diabetes [Internet]; 2013 [zitiert am 02.10.2016]; Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin (ÄZQ), Berlin; http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/fileadmin/Redakteur/Leitlinien/Evidenzbasierte_Leitlinien/NVL_Typ-2_Therapie-lang_Apr_2014.pdf; 1. Auflage, Version 3

- Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und bei postmenopausalen Frauen [Internet]; 2014 [zitiert am 01.09.2016]; Dachverband der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V., Bad Vilbel; <http://www.dv-osteologie.org/uploads/Leitlinie%202014/DVO-Leitlinie%20Osteoporose%202014%20Kurzfassung%20und%20Langfassung%20Version%201a%2012%2001%202016.pdf>; Version 1a
- Zerebrale Anfälle beim Neugeborenen [Internet]; 2012 [zitiert am 01.11.2016]; Deutsche Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin e.V., Datteln; http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/024-011l_S2k_Zerebrale_Anfaelle_beim_Neugeborenen_08-2012_1_.pdf; 024-011
- Lempiainen H., Muller A., Brasa S., Teo S. S., Roloff T. C., Morawiec L., Zamurovic N., Vicart A., Funhoff E., Couttet P., Schubeler D., Grenet O., Marlowe J., Moggs J. und Terranova R. (2011) Phenobarbital mediates an epigenetic switch at the constitutive androstane receptor (CAR) target gene Cyp2b10 in the liver of B6C3F1 mice, *PLoS One* 6(3), e18216; PMID #21455306
- Li C. Y., Cheng S. L., Bammler T. K. und Cui J. Y. (2016) Editor's Highlight: Neonatal Activation of the Xenobiotic-Sensors PXR and CAR Results in Acute and Persistent Down-regulation of PPARalpha-Signaling in Mouse Liver, *Toxicol Sci* 153(2), 282-302; PMID #27413110
- Li S., Jin S., Song C., Chen C., Zhang Y., Xiang Y., Xu Y., Feng Y., Wan Q. und Jiang H. (2016) The metabolic change of serum lysophosphatidylcholines involved in the lipid lowering effect of triterpenes from *Alismatis rhizoma* on high-fat diet induced hyperlipidemia mice, *J Ethnopharmacol* 177 10-18; PMID #26584875
- Li X., Jiang H., Qu L., Yao W., Cai H., Chen L. und Peng T. (2014) Hepatocyte nuclear factor 4alpha and downstream secreted phospholipase A2 GXIIB regulate production of infectious hepatitis C virus, *J Virol* 88(1), 612-627; PMID #24173221
- Lian J., Stewart C., Puchacz E., Mackowiak S., Shalhoub V., Collart D., Zambetti G. und Stein G. (1989) Structure of the rat osteocalcin gene and regulation of vitamin D-dependent expression, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(4), 1143-1147; PMID #2784002
- Lian J. B., Shalhoub V., Aslam F., Frenkel B., Green J., Hamrah M., Stein G. S. und Stein J. L. (1997) Species-specific glucocorticoid and 1,25-dihydroxyvitamin D responsiveness in mouse MC3T3-E1 osteoblasts: dexamethasone inhibits osteoblast differentiation and vitamin D down-regulates osteocalcin gene expression, *Endocrinology* 138(5), 2117-2127; PMID #9112412
- Lickteig A. J., Csanaky I. L., Pratt-Hyatt M. und Klaassen C. D. (2016) Activation of Constitutive Androstane Receptor (CAR) in Mice Results in Maintained Biliary Excretion of Bile Acids Despite a Marked Decrease of Bile Acids in Liver, *Toxicol Sci* 151(2), 403-418; PMID #26984780
- Lin C. W., Mars W. M., Paranjpe S., Donthamsetty S., Bhawe V. S., Kang L. I., Orr A., Bowen W. C., Bell A. W. und Michalopoulos G. K. (2011) Hepatocyte proliferation and hepatomegaly induced by phenobarbital and 1,4-bis [2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzene is suppressed in hepatocyte-targeted glypican 3 transgenic mice, *Hepatology* 54(2), 620-630; PMID #21574168
- Livak K. J. und Schmittgen T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods* 25(4), 402-408; PMID #11846609
- Lombo M., Fernandez-Diez C., Gonzalez-Rojo S., Navarro C., Robles V. und Herraes M. P. (2015) Transgenerational inheritance of heart disorders caused by paternal bisphenol A exposure, *Environ Pollut* 206 667-678; PMID #26322593
- Lopomo A., Burgio E. und Migliore L. (2016) Epigenetics of Obesity, *Prog Mol Biol Transl Sci* 140 151-184; PMID #27288829
- Loscher W., Nau H., Wahnschaffe U., Honack D., Rundfeldt C., Wittfoht W. und Bojic U. (1993) Effects of valproate and E-2-en-valproate on functional and morphological parameters of rat liver. II. Influence of phenobarbital comedication, *Epilepsy Res* 15(2), 113-131; PMID #8370349
- Lucado J., Paez K. und Elixhauser A. Medication-Related Adverse Outcomes in U.S. Hospitals and Emergency Departments, 2008: Statistical Brief #109. In: *Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs*, Rockville (MD) (2006).

- Luisier R., Lempiainen H., Scherbichler N., Braeuning A., Geissler M., Dubost V., Muller A., Scheer N., Chibout S. D., Hara H., Picard F., Theil D., Couttet P., Vitobello A., Grenet O., Grasl-Kraupp B., Ellinger-Ziegelbauer H., Thomson J. P., Meehan R. R., Elcombe C. R., Henderson C. J., Wolf C. R., Schwarz M., Moulin P., Terranova R. und Moggs J. G. (2014) Phenobarbital induces cell cycle transcriptional responses in mouse liver humanized for constitutive androstane and pregnane x receptors, *Toxicol Sci* 139(2), 501-511; PMID #24690595
- Lynch C., Pan Y., Li L., Heyward S., Moeller T., Swaan P. W. und Wang H. (2014) Activation of the constitutive androstane receptor inhibits gluconeogenesis without affecting lipogenesis or fatty acid synthesis in human hepatocytes, *Toxicol Appl Pharmacol* 279(1), 33-42; PMID #24878338
- Lynch T. und Price A. (2007) The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects, *Am Fam Physician* 76(3), 391-396; PMID #17708140
- Ma J., Chen X., Liu Y., Xie Q., Sun Y., Chen J., Leng L., Yan H., Zhao B. und Tang N. (2015) Ancestral TCDD exposure promotes epigenetic transgenerational inheritance of imprinted gene Igf2: Methylation status and DNMTs, *Toxicol Appl Pharmacol* 289(2), 193-202; PMID #26455773
- Ma X., Idle J. R. und Gonzalez F. J. (2008) The pregnane X receptor: from bench to bedside, *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4(7), 895-908; PMID #18624678
- Mackowiak B. und Wang H. (2016) Mechanisms of xenobiotic receptor activation: Direct vs. indirect, *Biochim Biophys Acta* 1859(9), 1130-1140; PMID #26877237
- Maglich J. M., Lobe D. C. und Moore J. T. (2009) The nuclear receptor CAR (NR113) regulates serum triglyceride levels under conditions of metabolic stress, *J Lipid Res* 50(3), 439-445; PMID #18941143
- Maglich J. M., Parks D. J., Moore L. B., Collins J. L., Goodwin B., Billin A. N., Stoltz C. A., Kliewer S. A., Lambert M. H., Willson T. M. und Moore J. T. (2003) Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes, *J Biol Chem* 278(19), 17277-17283; PMID #12611900
- Mancini M. C. (2009) Metabolic syndrome in children and adolescents - criteria for diagnosis, *Diabetol Metab Syndr* 1(1), 20; PMID #19840386
- Manikkam M., Haque M. M., Guerrero-Bosagna C., Nilsson E. E. und Skinner M. K. (2014) Pesticide methoxychlor promotes the epigenetic transgenerational inheritance of adult-onset disease through the female germline, *PLoS One* 9(7), e102091; PMID #25057798
- Marino M., Di Masi A., Trezza V., Pallottini V., Polticelli F. und Ascenzi P. (2011) Xenosensors CAR and PXR at work: impact on statin metabolism, *Curr Drug Metab* 12(3), 300-311; PMID #21395534
- Masson D., Qatanani M., Sberna A. L., Xiao R., Pais De Barros J. P., Grober J., Deckert V., Athias A., Gambert P., Lagrost L., Moore D. D. und Assem M. (2008) Activation of the constitutive androstane receptor decreases HDL in wild-type and human apoA-I transgenic mice, *J Lipid Res* 49(8), 1682-1691; PMID #18441373
- Masuyama H. und Hiramatsu Y. (2012) Treatment with constitutive androstane receptor ligand during pregnancy prevents insulin resistance in offspring from high-fat diet-induced obese pregnant mice, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303(2), E293-300; PMID #22649068
- Mathäs M. (2014) Unmittelbare, dauerhafte sowie evolutionäre Anpassung an Fremdstoffexpositionen, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz (Dissertation)
- Mathas M., Burk O., Qiu H., Nushag C., Godtel-Armbrust U., Baranyai D., Deng S., Romer K., Nem D., Windshugel B. und Wojnowski L. (2012) Evolutionary history and functional characterization of the amphibian xenosensor CAR, *Mol Endocrinol* 26(1), 14-26; PMID #22074953
- Mathas M., Nushag C., Burk O., Godtel-Armbrust U., Herlyn H., Wojnowski L. und Windshugel B. (2016) Correction: Structural and Functional Similarity of Amphibian Constitutive Androstane Receptor with Mammalian Pregnane X Receptor, *PLoS One* 11(2), e0148703; PMID #26829328
- Mbatchi L. C., Robert J., Ychou M., Boyer J. C., Del Rio M., Gassiot M., Thomas F., Tubiana N. und Evrard A. (2016) Effect of Single Nucleotide Polymorphisms in the Xenobiotic-sensing Receptors NR112 and NR113 on the Pharmacokinetics and Toxicity of Irinotecan in Colorectal Cancer Patients, *Clin Pharmacokinet* 55(9), 1145-1157; PMID #27116457

- Medsafe (2015), Medicine Use in Lactation, [zitiert am 25.02.2017], <http://www.medsafe.govt.nz/profs/puarticles/June2015/June2015Lactation.htm>
- Meier C. und Kraenzlin M. E. (2011) Antiepileptics and bone health, *Ther Adv Musculoskelet Dis* 3(5), 235-243; PMID #22870482
- Merry C., Barry M. G., Mulcahy F., Tjia J. F., Halifax K. L., Heavey J., Kelly C. und Back D. J. (1998) Ritonavir pharmacokinetics alone and in combination with saquinavir in HIV-infected patients, *AIDS* 12(3), 325-327; PMID #9517997
- Miao J., Fang S., Bae Y. und Kemper J. K. (2006) Functional inhibitory cross-talk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1alpha, *J Biol Chem* 281(21), 14537-14546; PMID #16492670
- Middaugh L. D., Santos C. A., 3rd und Zemp J. W. (1975) Phenobarbital during pregnancy alters operant behavior of offspring in C57BL/6J mice, *Pharmacol Biochem Behav* 3(6), 1137-1139; PMID #1223902
- Miller R. A., Chu Q., Xie J., Foretz M., Viollet B. und Birnbaum M. J. (2013) Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP, *Nature* 494(7436), 256-260; PMID #23292513
- Min G., Kemper J. K. und Kemper B. (2002) Glucocorticoid receptor-interacting protein 1 mediates ligand-independent nuclear translocation and activation of constitutive androstane receptor in vivo, *J Biol Chem* 277(29), 26356-26363; PMID #12000748
- Mirbahai L. und Chipman J. K. (2014) Epigenetic memory of environmental organisms: a reflection of lifetime stressor exposures, *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 764-765 10-17; PMID #24141178
- Mo L. und He J. (2014) Nuclear hormone receptors PXR and CAR and metabolic diseases, *Horm Mol Biol Clin Investig* 19(2), 129-140; PMID #25390021
- Molnar F., Kublbeck J., Jyrkkarine J., Prantner V. und Honkakoski P. (2013) An update on the constitutive androstane receptor (CAR), *Drug Metabol Drug Interact* 28(2), 79-93; PMID #23729557
- Moore L. B., Maglich J. M., Mckee D. D., Wisely B., Willson T. M., Kliewer S. A., Lambert M. H. und Moore J. T. (2002) Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors, *Mol Endocrinol* 16(5), 977-986; PMID #11981033
- Moore L. B., Parks D. J., Jones S. A., Bledsoe R. K., Consler T. G., Stimmel J. B., Goodwin B., Liddle C., Blanchard S. G., Willson T. M., Collins J. L. und Kliewer S. A. (2000) Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands, *J Biol Chem* 275(20), 15122-15127; PMID #10748001
- Moreau A., Maurel P., Vilarem M. J. und Pascussi J. M. (2007) Constitutive androstane receptor-vitamin D receptor crosstalk: consequence on CYP24 gene expression, *Biochem Biophys Res Commun* 360(1), 76-82; PMID #17585873
- Moreau A., Vilarem M. J., Maurel P. und Pascussi J. M. (2008) Xenoreceptors CAR and PXR activation and consequences on lipid metabolism, glucose homeostasis, and inflammatory response, *Mol Pharm* 5(1), 35-41; PMID #18159929
- Muangmoonchai R., Smirlis D., Wong S. C., Edwards M., Phillips I. R. und Shephard E. A. (2001) Xenobiotic induction of cytochrome P450 2B1 (CYP2B1) is mediated by the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (CAR) and requires steroid co-activator 1 (SRC-1) and the transcription factor Sp1, *Biochem J* 355(Pt 1), 71-78; PMID #11256950
- Murray S. A., Morgan J. L., Kane C., Sharma Y., Heffner C. S., Lake J. und Donahue L. R. (2010) Mouse gestation length is genetically determined, *PLoS One* 5(8), e12418; PMID #20811634
- Mutoh S., Sobhany M., Moore R., Perera L., Pedersen L., Sueyoshi T. und Negishi M. (2013) Phenobarbital indirectly activates the constitutive active androstane receptor (CAR) by inhibition of epidermal growth factor receptor signaling, *Sci Signal* 6(274), ra31; PMID #23652203

- Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H. K., Menzel S. und Ruth P., *Mutschler Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie ; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie.* (10., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage). WVG, Stuttgart (2013)
- Nakagata N., *Reproductive Engineering Techniques in Mice.* (2014)
- Nakajima M., Yamanaka H., Fujiwara R., Katoh M. und Yokoi T. (2007) Stereoselective glucuronidation of 5-(4'-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin by human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1, UGT1A9, and UGT2B15: effects of UGT-UGT interactions, *Drug Metab Dispos* 35(9), 1679-1686; PMID #17576806
- Nilsson E. E. und Skinner M. K. (2015) Environmentally Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Reproductive Disease, *Biol Reprod* 93(6), 145; PMID #26510870
- Nishimura M., Naito S. und Yokoi T. (2004) Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies, *Drug Metab Pharmacokinet* 19(2), 135-149; PMID #15499180
- Notelovitz M. (2002) Androgen effects on bone and muscle, *Fertil Steril* 77 Suppl 4 S34-41; PMID #12007900
- Oldknow K. J., Macrae V. E. und Farquharson C. (2015) Endocrine role of bone: recent and emerging perspectives beyond osteocalcin, *J Endocrinol* 225(1), R1-19; PMID #25655764
- Omicinski C. J., Coslo D. M., Chen T., Laurenzana E. M. und Peffer R. C. (2011a) Multi-species analyses of direct activators of the constitutive androstane receptor, *Toxicol Sci* 123(2), 550-562; PMID #21778469
- Omicinski C. J., Vanden Heuvel J. P., Perdew G. H. und Peters J. M. (2011b) Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities, *Toxicol Sci* 120 Suppl 1 S49-75; PMID #21059794
- Onodera K., Takahashi A., Mayanagi H., Wakabayashi H., Kamei J. und Shinoda H. (2001) Phenytoin-induced bone loss and its prevention with alfacalcidol or calcitriol in growing rats, *Calcif Tissue Int* 69(2), 109-116; PMID #11683423
- Orans J., Teotico D. G. und Redinbo M. R. (2005) The nuclear xenobiotic receptor pregnane X receptor: recent insights and new challenges, *Mol Endocrinol* 19(12), 2891-2900; PMID #15961506
- Osabe M. und Negishi M. (2011) Active ERK1/2 protein interacts with the phosphorylated nuclear constitutive active/androstane receptor (CAR; NR1I3), repressing dephosphorylation and sequestering CAR in the cytoplasm, *J Biol Chem* 286(41), 35763-35769; PMID #21873423
- Otto Buczkowska E., Szirer G. und Jarosz-Chobot P. (2001) [Glucose homeostasis in children. I. Regulation of blood glucose], *Przegl Lek* 58(1), 20-24; PMID #11450150
- Pack A. M. und Morrell M. J. (2004) Epilepsy and bone health in adults, *Epilepsy Behav* 5 Suppl 2 S24-29; PMID #15123008
- Painter R. C., Osmond C., Gluckman P., Hanson M., Phillips D. I. und Roseboom T. J. (2008) Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life, *BJOG* 115(10), 1243-1249; PMID #18715409
- Parikh N. I., Pencina M. J., Wang T. J., Lanier K. J., Fox C. S., D'agostino R. B. und Vasan R. S. (2007) Increasing trends in incidence of overweight and obesity over 5 decades, *Am J Med* 120(3), 242-250; PMID #17349447
- Park Y. J., Lee E. K., Lee Y. K., Park D. J., Jang H. C. und Moore D. D. (2012) Opposing regulation of cytochrome P450 expression by CAR and PXR in hypothyroid mice, *Toxicol Appl Pharmacol* 263(2), 131-137; PMID #22503787
- Pascussi J. M., Gerbal-Chaloin S., Duret C., Daujat-Chavanieu M., Vilarem M. J. und Maurel P. (2008) The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48 1-32; PMID #17608617
- Patti A., Gennari L., Merlotti D., Dotta F. und Nuti R. (2013) Endocrine actions of osteocalcin, *Int J Endocrinol* 2013 846480; PMID #23737779
- Peng L., Yoo B., Gunewardena S. S., Lu H., Klaassen C. D. und Zhong X. B. (2012) RNA sequencing reveals dynamic changes of mRNA abundance of cytochromes P450 and their alternative transcripts during mouse liver development, *Drug Metab Dispos* 40(6), 1198-1209; PMID #22434873

- Penzlin H. und Beinbrech G., *Lehrbuch der Tierphysiologie*. (7., neu bearb. und erw. Aufl., unveränd. Nachdr.). Spektrum Akad. Verl., Heidelberg (2009)
- Petzinger E. und Geyer J. (2006) Drug transporters in pharmacokinetics, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372(6), 465-475; PMID #16532306
- Piscitelli S. C., Burstein A. H., Chaitt D., Alfaro R. M. und Falloon J. (2000) Indinavir concentrations and St John's wort, *Lancet* 355(9203), 547-548; PMID #10683007
- Platzker A. C., Lew C. D. und Stewart D. (1980) Drug 'administration' via breast milk, *Hosp Pract* 15(9), 111-117, 120-112; PMID #7409788
- Poland A., Mak I., Glover E., Boatman R. J., Ebetino F. H. und Kende A. S. (1980) 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene, a potent phenobarbital-like inducer of microsomal monooxygenase activity, *Mol Pharmacol* 18(3), 571-580; PMID #7464820
- Powell D. R., Gay J. P., Wilganowski N., Doree D., Savelieva K. V., Lanthorn T. H., Read R., Vogel P., Hansen G. M., Brommage R., Ding Z. M., Desai U. und Zambrowicz B. (2015) Diacylglycerol Lipase alpha Knockout Mice Demonstrate Metabolic and Behavioral Phenotypes Similar to Those of Cannabinoid Receptor 1 Knockout Mice, *Front Endocrinol (Lausanne)* 6 86; PMID #26082754
- Qiu H., Mathas M., Nestler S., Bengel C., Nem D., Godtel-Armbrust U., Lang T., Taudien S., Burk O. und Wojnowski L. (2010) The unique complexity of the CYP3A4 upstream region suggests a nongenetic explanation of its expression variability, *Pharmacogenet Genomics* 20(3), 167-178; PMID #20147837
- Quinnies K. M., Doyle T. J., Kim K. H. und Rissman E. F. (2015) Transgenerational Effects of Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP) on Stress Hormones and Behavior, *Endocrinology* 156(9), 3077-3083; PMID #26168342
- Rached M. T., Kode A., Silva B. C., Jung D. Y., Gray S., Ong H., Paik J. H., Depinho R. A., Kim J. K., Karsenty G. und Kousteni S. (2010) FoxO1 expression in osteoblasts regulates glucose homeostasis through regulation of osteocalcin in mice, *J Clin Invest* 120(1), 357-368; PMID #20038793
- Radford E. J., Ito M., Shi H., Corish J. A., Yamazawa K., Isganaitis E., Seisenberger S., Hore T. A., Reik W., Erkek S., Peters A., Patti M. E. und Ferguson-Smith A. C. (2014) In utero effects. In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism, *Science* 345(6198), 1255903; PMID #25011554
- Radhakrishnan P., Basma H., Klinkebiel D., Christman J. und Cheng P. W. (2008) Cell type-specific activation of the cytomegalovirus promoter by dimethylsulfoxide and 5-aza-2'-deoxycytidine, *Int J Biochem Cell Biol* 40(9), 1944-1955; PMID #18373939
- Ray W. A., Murray K. T., Meredith S., Narasimhulu S. S., Hall K. und Stein C. M. (2004) Oral erythromycin and the risk of sudden death from cardiac causes, *N Engl J Med* 351(11), 1089-1096; PMID #15356306
- Rezen T., Tamasi V., Lovgren-Sandblom A., Bjorkhem I., Meyer U. A. und Rozman D. (2009) Effect of CAR activation on selected metabolic pathways in normal and hyperlipidemic mouse livers, *BMC Genomics* 10 384; PMID #19691840
- Ring B. J., Seitz K. R., Gallenberg L. A. und Vodcnik M. J. (1990) The effect of diet and litter size on the elimination of 2,4,5,2',4',5'-[14C]hexachlorobiphenyl from lactating mice, *Toxicol Appl Pharmacol* 104(1), 9-16; PMID #2113721
- Robert E. (1983) Valproic acid in pregnancy--association with spina bifida: a preliminary report, *Clin Pediatr (Phila)* 22(5), 336; PMID #6404581
- Rote Hand Brief: Wichtige neue Einschränkungen für die Anwendung von Protelos® (Strontiumranelat) nachdem neue Daten ein erhöhtes Risiko für Myokardinfarkt gezeigt haben [Internet]; 13.05.2013 [zitiert am 01.09.2016]; Servier Deutschland GmbH, München; <https://www.akdae.de/Arzneimittelsicherheit/RHB/Archiv/2013/20130513.pdf>;
- Rousseaux S., Caron C., Govin J., Lestrat C., Faure A. K. und Khochbin S. (2005) Establishment of male-specific epigenetic information, *Gene* 345(2), 139-153; PMID #15716030
- Ruschitzka F., Meier P. J., Turina M., Luscher T. F. und Noll G. (2000) Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort, *Lancet* 355(9203), 548-549; PMID #10683008

- Robert Wood Johnson Foundation Washington, DC (2016), The State of Obesity: Better Better Policies for a Healthier America [zitiert am 01.09.2016] <http://healthyamericans.org/assets/files/TFAH-2016-ObesityReport-FINAL.pdf>
- Sachdeva P., Patel B. G. und Patel B. K. (2009) Drug use in pregnancy; a point to ponder!, *Indian J Pharm Sci* 71(1), 1-7; PMID #20177448
- Salian S., Doshi T. und Vanage G. (2009) Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the fertility of male offspring, *Life Sci* 85(21-22), 742-752; PMID #19837096
- Sandelin A. und Wasserman W. W. (2005) Prediction of nuclear hormone receptor response elements, *Mol Endocrinol* 19(3), 595-606; PMID #15563547
- Sasaki H. und Matsui Y. (2008) Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond, *Nat Rev Genet* 9(2), 129-140; PMID #18197165
- Sattar N., Preiss D., Murray H. M., Welsh P., Buckley B. M., De Craen A. J., Seshasai S. R., McMurray J. J., Freeman D. J., Jukema J. W., Macfarlane P. W., Packard C. J., Stott D. J., Westendorp R. G., Shepherd J., Davis B. R., Pressel S. L., Marchioli R., Marfisi R. M., Maggioni A. P., Tavazzi L., Tognoni G., Kjekshus J., Pedersen T. R., Cook T. J., Gotto A. M., Clearfield M. B., Downs J. R., Nakamura H., Ohashi Y., Mizuno K., Ray K. K. und Ford I. (2010) Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials, *Lancet* 375(9716), 735-742; PMID #20167359
- Sattar N. A., Ginsberg H., Ray K., Chapman M. J., Arca M., Averna M., Betteridge D. J., Bhatnagar D., Bilianou E., Carmena R., Ceska R., Corsini A., Erbel R., Flynn P. D., Garcia-Moll X., Gumprecht J., Ishibashi S., Jambart S., Kastelein J. J., Maher V., Da Silva P. M., Masana L., Odawara M., Pedersen T. R., Rotella C. M., Salti I., Teramoto T., Tokgozoglu L., Toth P. P., Valensi P. und Verges B. (2014) The use of statins in people at risk of developing diabetes mellitus: evidence and guidance for clinical practice, *Atheroscler Suppl* 15(1), 1-15; PMID #24840509
- Savary C. C., Josse R., Bruyere A., Guillet F., Robin M. A. und Guillouzo A. (2014) Interactions of endosulfan and methoxychlor involving CYP3A4 and CYP2B6 in human HepaRG cells, *Drug Metab Dispos* 42(8), 1235-1240; PMID #24832206
- Scheer N., Ross J., Rode A., Zevnik B., Niehaves S., Faust N. und Wolf C. R. (2008) A novel panel of mouse models to evaluate the role of human pregnane X receptor and constitutive androstane receptor in drug response, *J Clin Invest* 118(9), 3228-3239; PMID #18677425
- Schenkel J., *Transgene Tiere mit 20 Tabellen.* (2., überarb. und aktualisierte Aufl.). Springer, Berlin [u.a.] (2006)
- Schirmer M., Toliat M. R., Haberl M., Suk A., Kamdem L. K., Klein K., Brockmoller J., Nurnberg P., Zanger U. M. und Wojnowski L. (2006) Genetic signature consistent with selection against the CYP3A4*1B allele in non-African populations, *Pharmacogenet Genomics* 16(1), 59-71; PMID #16344723
- Schlemmer A. und Hassager C. (1999) Acute fasting diminishes the circadian rhythm of biochemical markers of bone resorption, *Eur J Endocrinol* 140(4), 332-337; PMID #10097253
- Schurter B. T., Koh S. S., Chen D., Bunick G. J., Harp J. M., Hanson B. L., Henschen-Edman A., Mackay D. R., Stallcup M. R. und Aswad D. W. (2001) Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1, *Biochemistry* 40(19), 5747-5756; PMID #11341840
- Scofield M. D. und Kalivas P. W. (2013) Forgiving the sins of the fathers, *Nat Neurosci* 16(1), 4-5; PMID #23257926
- Seibel M. J. (2005) Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability, *Clin Biochem Rev* 26(4), 97-122; PMID #16648882
- Siddiqi A., Parsons M. P., Lewis J. L., Monson J. P., Williams G. R. und Burrin J. M. (2002) TR expression and function in human bone marrow stromal and osteoblast-like cells, *J Clin Endocrinol Metab* 87(2), 906-914; PMID #11836340
- Skinner M. K. (2008) What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2, *Reprod Toxicol* 25(1), 2-6; PMID #17949945
- Skinner M. K. (2015) Environmental Epigenetics and a Unified Theory of the Molecular Aspects of Evolution: A Neo-Lamarckian Concept that Facilitates Neo-Darwinian Evolution, *Genome Biol Evol* 7(5), 1296-1302; PMID #25917417

- Skinner M. K. (2016) Endocrine disruptors in 2015: Epigenetic transgenerational inheritance, *Nat Rev Endocrinol* 12(2), 68-70; PMID #26585656
- Slaughter R. L. (2013) Pharmacokinetic behavior presents drug therapy challenges, *Expert Rev Clin Pharmacol* 6(6), 627-639; PMID #24164611
- Smith G., Henderson C. J., Parker M. G., White R., Bars R. G. und Wolf C. R. (1993) 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene, an extremely potent modulator of mouse hepatic cytochrome P-450 gene expression, *Biochem J* 289 (Pt 3) 807-813; PMID #8435079
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J. und Klenk D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal Biochem* 150(1), 76-85; PMID #3843705
- Soares A. P., Do Espirito Santo R. F., Line S. R., Pinto M., Santos Pde M., Toralles M. B. und Do Espirito Santo A. R. (2016) Bisphosphonates: Pharmacokinetics, bioavailability, mechanisms of action, clinical applications in children, and effects on tooth development, *Environ Toxicol Pharmacol* 42 212-217; PMID #26895384
- Solomon G. M. und Weiss P. M. (2002) Chemical contaminants in breast milk: time trends and regional variability, *Environ Health Perspect* 110(6), A339-347; PMID #12055065
- Spencer T. E., Jenster G., Burcin M. M., Allis C. D., Zhou J., Mizzen C. A., Mckenna N. J., Onate S. A., Tsai S. Y., Tsai M. J. und O'malley B. W. (1997) Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase, *Nature* 389(6647), 194-198; PMID #9296499
- Stanley L. A., Horsburgh B. C., Ross J., Scheer N. und Wolf C. R. (2006) PXR and CAR: nuclear receptors which play a pivotal role in drug disposition and chemical toxicity, *Drug Metab Rev* 38(3), 515-597; PMID #16877263
- Sueyoshi T., Moore R., Sugatani J., Matsumura Y. und Negishi M. (2008) PPP1R16A, the membrane subunit of protein phosphatase 1beta, signals nuclear translocation of the nuclear receptor constitutive active/androstane receptor, *Mol Pharmacol* 73(4), 1113-1121; PMID #18202305
- Suino K., Peng L., Reynolds R., Li Y., Cha J. Y., Repa J. J., Kliewer S. A. und Xu H. E. (2004) The nuclear xenobiotic receptor CAR: structural determinants of constitutive activation and heterodimerization, *Mol Cell* 16(6), 893-905; PMID #15610733
- Sultana J., Cutroneo P. und Trifiro G. (2013) Clinical and economic burden of adverse drug reactions, *J Pharmacol Pharmacother* 4(Suppl 1), S73-77; PMID #24347988
- Swales K. und Negishi M. (2004) CAR, driving into the future, *Mol Endocrinol* 18(7), 1589-1598; PMID #14988430
- Takizawa D., Kakizaki S., Horiguchi N., Tojima H., Yamazaki Y., Ichikawa T., Sato K. und Mori M. (2010) Histone deacetylase inhibitors induce cytochrome P450 2B by activating nuclear receptor constitutive androstane receptor, *Drug Metab Dispos* 38(9), 1493-1498; PMID #20516253
- Tateishi T., Nakura H., Asoh M., Watanabe M., Tanaka M., Kumai T., Takashima S., Imaoka S., Funae Y., Yabusaki Y., Kamataki T. und Kobayashi S. (1997) A comparison of hepatic cytochrome P450 protein expression between infancy and postinfancy, *Life Sci* 61(26), 2567-2574; PMID #9416779
- Testa B. und Kramer S. D. (2006) The biochemistry of drug metabolism--an introduction: part 1. Principles and overview, *Chem Biodivers* 3(10), 1053-1101; PMID #17193224
- Thomson J. P., Moggs J. G., Wolf C. R. und Meehan R. R. (2014) Epigenetic profiles as defined signatures of xenobiotic exposure, *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 764-765 3-9; PMID #24001620
- Tien E. S., Matsui K., Moore R. und Negishi M. (2007) The nuclear receptor constitutively active/androstane receptor regulates type 1 deiodinase and thyroid hormone activity in the regenerating mouse liver, *J Pharmacol Exp Ther* 320(1), 307-313; PMID #17050775
- Tien Y. C., Liu K., Pope C., Wang P., Ma X. und Zhong X. B. (2015) Dose of Phenobarbital and Age of Treatment at Early Life are Two Key Factors for the Persistent Induction of Cytochrome P450 Enzymes in Adult Mouse Liver, *Drug Metab Dispos* 43(12), 1938-1945; PMID #26400395
- Timsit Y. E. und Negishi M. (2007) CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors, *Steroids* 72(3), 231-246; PMID #17284330

- Timsit Y. E. und Negishi M. (2014) Coordinated regulation of nuclear receptor CAR by CCRP/DNAJC7, HSP70 and the ubiquitin-proteasome system, *PLoS One* 9(5), e96092; PMID #24789201
- Tojima H., Kakizaki S., Yamazaki Y., Takizawa D., Horiguchi N., Sato K. und Mori M. (2012) Ligand dependent hepatic gene expression profiles of nuclear receptors CAR and PXR, *Toxicol Lett* 212(3), 288-297; PMID #22698814
- Tolson A. H. und Wang H. (2010) Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR, *Adv Drug Deliv Rev* 62(13), 1238-1249; PMID #20727377
- Toth M. (2015) Mechanisms of non-genetic inheritance and psychiatric disorders, *Neuropsychopharmacology* 40(1), 129-140; PMID #24889369
- Townsend C. R., Harper J. L., Begon M. E. und Steidle J., *Ökologie mit 25 Tabellen*. Springer, Berlin [u.a.] (2003)
- Tralau T. und Luch A. (2013) The evolution of our understanding of endo-xenobiotic crosstalk and cytochrome P450 regulation and the therapeutic implications, *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 9(12), 1541-1554; PMID #23941336
- Triplitt C. L. (2012) Examining the mechanisms of glucose regulation, *Am J Manag Care* 18(1 Suppl), S4-10; PMID #22559855
- Truett G. E., Heeger P., Mynatt R. L., Truett A. A., Walker J. A. und Warman M. L. (2000) Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT), *Biotechniques* 29(1), 52, 54; PMID #10907076
- Turpeinen M. und Zanger U. M. (2012) Cytochrome P450 2B6: function, genetics, and clinical relevance, *Drug Metabol Drug Interact* 27(4), 185-197; PMID #23152403
- Tzamelis I., Pissios P., Schuetz E. G. und Moore D. D. (2000) The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR, *Mol Cell Biol* 20(9), 2951-2958; PMID #10757780
- Uchida M., Ozono K. und Pike J. W. (1994) Activation of the human osteocalcin gene by 24R,25-dihydroxyvitamin D3 occurs through the vitamin D receptor and the vitamin D-responsive element, *J Bone Miner Res* 9(12), 1981-1987; PMID #7872065
- Ueda A., Hamadeh H. K., Webb H. K., Yamamoto Y., Sueyoshi T., Afshari C. A., Lehmann J. M. und Negishi M. (2002) Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital, *Mol Pharmacol* 61(1), 1-6; PMID #11752199
- Uppal H., Toma D., Saini S. P., Ren S., Jones T. J. und Xie W. (2005) Combined loss of orphan receptors PXR and CAR heightens sensitivity to toxic bile acids in mice, *Hepatology* 41(1), 168-176; PMID #15619241
- Urano T., Usui T., Shiraki M., Ouchi Y. und Inoue S. (2009) Association of a single nucleotide polymorphism in the constitutive androstane receptor gene with bone mineral density, *Geriatr Gerontol Int* 9(3), 235-241; PMID #19702932
- Van Den Berg M., Kypke K., Kotz A., Tritscher A., Lee S. Y., Magulova K., Fiedler H. und Malisch R. (2017) WHO/UNEP global surveys of PCDDs, PCDFs, PCBs and DDTs in human milk and benefit-risk evaluation of breastfeeding, *Arch Toxicol* 91(1), 83-96; PMID #27438348
- Van Driel M. und Van Leeuwen J. P. (2014) Vitamin D endocrine system and osteoblasts, *Bonekey Rep* 3 493; PMID #24605210
- Vanderschueren D., Vandenput L., Boonen S., Lindberg M. K., Bouillon R. und Ohlsson C. (2004) Androgens and bone, *Endocr Rev* 25(3), 389-425; PMID #15180950
- Varga F., Spitzer S., Rumpler M. und Klaushofer K. (2003) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits thyroid hormone-induced osteocalcin expression in mouse osteoblast-like cells via a thyroid hormone response element, *J Mol Endocrinol* 30(1), 49-57; PMID #12580760
- Vassoler F. M., White S. L., Schmidt H. D., Sadri-Vakili G. und Pierce R. C. (2013) Epigenetic inheritance of a cocaine-resistance phenotype, *Nat Neurosci* 16(1), 42-47; PMID #23242310
- Veenendaal M. V., Painter R. C., De Rooij S. R., Bossuyt P. M., Van Der Post J. A., Gluckman P. D., Hanson M. A. und Roseboom T. J. (2013) Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45 Dutch famine, *BJOG* 120(5), 548-553; PMID #23346894

- Venkatesan N., Davidson M. B., Simsolo R. B. und Kern P. A. (1994) Phenobarbital treatment enhances insulin-mediated glucose metabolism and improves lipid metabolism in the diabetic rat, *Metabolism* 43(3), 348-356; PMID #8139483
- Vico L. und Vanacker J. M. (2010) Sex hormones and their receptors in bone homeostasis: insights from genetically modified mouse models, *Osteoporos Int* 21(3), 365-372; PMID #19495826
- Voet D., Voet J. G., Pratt C. W. und Beck-Sickinger A. G. (2002), Lehrbuch der Biochemie, [zitiert am <http://www.gbv.de/dms/hbz/toc/ht013458184.pdf>
<http://d-nb.info/966024052/04>
- Wada T., Gao J. und Xie W. (2009) PXR and CAR in energy metabolism, *Trends Endocrinol Metab* 20(6), 273-279; PMID #19595610
- Weaver I. C., Cervoni N., Champagne F. A., D'alessio A. C., Sharma S., Seckl J. R., Dymov S., Szyf M. und Meaney M. J. (2004) Epigenetic programming by maternal behavior, *Nat Neurosci* 7(8), 847-854; PMID #15220929
- Weaver I. C., D'alessio A. C., Brown S. E., Hellstrom I. C., Dymov S., Sharma S., Szyf M. und Meaney M. J. (2007) The transcription factor nerve growth factor-inducible protein a mediates epigenetic programming: altering epigenetic marks by immediate-early genes, *J Neurosci* 27(7), 1756-1768; PMID #17301183
- Wehner R., Gehring W. und Kühn A., *Zoologie 17 Tabellen ; Glossar mit 830 Stichworten.* (24., vollst. überarb. Aufl.). Thieme, Stuttgart [u.a.] (2007)
- Wei P., Zhang J., Dowhan D. H., Han Y. und Moore D. D. (2002) Specific and overlapping functions of the nuclear hormone receptors CAR and PXR in xenobiotic response, *Pharmacogenomics J* 2(2), 117-126; PMID #12049174
- Weiske R., Garrelfs U. C. und Lingg G. M., *Osteoporose Atlas der radiologischen Diagnostik und Differentialdiagnose.* G. Fischer, Stuttgart [u.a.] (1998)
- Wessel D. und Flugge U. I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids, *Anal Biochem* 138(1), 141-143; PMID #6731838
- Wheater G., Elshahaly M., Tuck S. P., Datta H. K. und Van Laar J. M. (2013) The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis, *J Transl Med* 11 201; PMID #23984630
- Who, *Persistent Organic Pollutants: Impact on Child Health.* WHO Document Production Services, Genf (CH) (2010)
- Who (2016a), Fact Sheet No. 311 - Obesity and Overweight, Fact Sheets, [zitiert am 01.09.2016], <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
- Who (2016b), Fact Sheet No. 312 - Diabetes, Fact Sheets, [zitiert am 16.07.2017], <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>
- Who (2016c), Raised cholesterol, Global Health Observatory (GHO) data, [zitiert am 01.09.2016], http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/cholesterol_text/en/
- Wilkinson G. R. (2005) Drug metabolism and variability among patients in drug response, *N Engl J Med* 352(21), 2211-2221; PMID #15917386
- Williams R. T., *Detoxification Mechanisms: The Metabolism and Detoxification of Drugs, Toxic Substances and Other Organic Compounds.* Chapman and Hall, (1959)
- Willson T. M. und Kliewer S. A. (2002) PXR, CAR and drug metabolism, *Nat Rev Drug Discov* 1(4), 259-266; PMID #12120277
- Wong C. H. und Cheng C. Y. (2005) The blood-testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis, *Curr Top Dev Biol* 71 263-296; PMID #16344108
- Xie W., *Nuclear receptors in drug metabolism.* Wiley, Hoboken, NJ (2009)
- Yan J., Chen B., Lu J. und Xie W. (2015) Deciphering the roles of the constitutive androstane receptor in energy metabolism, *Acta Pharmacol Sin* 36(1), 62-70; PMID #25500869
- Yang H. und Wang H. (2014) Signaling control of the constitutive androstane receptor (CAR), *Protein Cell* 5(2), 113-123; PMID #24474196
- Yasujima T., Saito K., Moore R. und Negishi M. (2016) Phenobarbital and Insulin Reciprocate Activation of the Nuclear Receptor Constitutive Androstane Receptor through the Insulin Receptor, *J Pharmacol Exp Ther* 357(2), 367-374; PMID #26994072

- Yoshinari K., Kobayashi K., Moore R., Kawamoto T. und Negishi M. (2003) Identification of the nuclear receptor CAR:HSP90 complex in mouse liver and recruitment of protein phosphatase 2A in response to phenobarbital, *FEBS Lett* 548(1-3), 17-20; PMID #12885400
- Zanger U. M. und Klein K. (2013) Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance, *Front Genet* 4 24; PMID #23467454
- Zanger U. M. und Schwab M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation, *Pharmacol Ther* 138(1), 103-141; PMID #23333322
- Zee Y. K., Goh B. C. und Lee S. C. (2012) Pharmacologic modulation strategies to reduce dose requirements of anticancer therapy while preserving clinical efficacy, *Future Oncol* 8(6), 731-749; PMID #22764771
- Zhai Y., Wada T., Zhang B., Khadem S., Ren S., Kuruba R., Li S. und Xie W. (2010) A functional cross-talk between liver X receptor-alpha and constitutive androstane receptor links lipogenesis and xenobiotic responses, *Mol Pharmacol* 78(4), 666-674; PMID #20592274
- Zhang J., Huang W., Qatanani M., Evans R. M. und Moore D. D. (2004) The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor function coordinately to prevent bile acid-induced hepatotoxicity, *J Biol Chem* 279(47), 49517-49522; PMID #15358766
- Zhou S., Chan E., Pan S. Q., Huang M. und Lee E. J. (2004) Pharmacokinetic interactions of drugs with St John's wort, *J Psychopharmacol* 18(2), 262-276; PMID #15260917

A Anhang

A1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad <u>C</u> elsius
®	Registered Trade Mark
µg	Mikro <u>g</u> ramm
µL	Mikro <u>l</u> iter
µm	Mikro <u>m</u> eter
µM	Mikro <u>m</u> ol
Abb.	<u>A</u> bbildung
ABC	, <u>A</u> TP- <u>b</u> inding- <u>c</u> assette‘
ACN	<u>A</u> ce <u>t</u> on <u>i</u> tril
AF	<u>A</u> ktivierung <u>s</u> fun <u>k</u> tion
AG	<u>A</u> ktiengesellschaft
AhR	<u>A</u> ryl- <u>H</u> ydrocarbon- <u>R</u> ezeptor
AIB	, <u>A</u> mplified i <u>n</u> <u>b</u> reast cancer‘
ApoA1	<u>A</u> polipoprotein <u>A</u> 1
APS	<u>A</u> mmoniumperoxodisulfat
ASC	, <u>A</u> ctivating <u>s</u> ignal <u>c</u> o-integrator‘
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (<u>b</u> icin <u>h</u> oninic <u>a</u> cid‘)
BCRP	, <u>B</u> reast <u>C</u> ancer <u>R</u> esistance <u>P</u> rotein‘
Bdnf	, <u>B</u> rain- <u>d</u> erived <u>n</u> eurotrophic <u>f</u> actor‘
BMD	Knochenmineraldichte (<u>b</u> one <u>m</u> ineral <u>d</u> ensity‘)
Bp	Basenpaare (<u>B</u> ase <u>p</u> airs‘)
BPA	<u>B</u> isphenol <u>A</u>
BV/TV	Knochen-Volumen-Anteil (<u>B</u> one <u>V</u> olume per <u>T</u> issue <u>V</u> olume‘)
bzw.	<u>b</u> e <u>z</u> iehu <u>n</u> gs <u>w</u> eise

ca.	Zirka (<u>c</u> irca)
CAR	konstitutiver Androstanrezeptor (<u>c</u> onstitutive <u>a</u> ndrostane <u>r</u> eceptor')
CBP	<u>C</u> REB- <u>b</u> inding <u>p</u> rotein'
CCRP	<u>c</u> ytoplasmic <u>C</u> AR <u>r</u> etention <u>p</u> rotein'
cDNA	komplementäre DNA (<u>c</u> omplementary <u>D</u> NA')
CITCO	6-(4-Chlorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehyde O-(3,4-dichlorobenzyl)oxime
cm	Zentimeter (<u>c</u> entimeter')
cm ³	Kubikzentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
Col	Kollagen
CT	<u>C</u> omputer <u>t</u> omographie
Ct.Th	kortikale Dicke (<u>C</u> ortical <u>T</u> hickness')
CTX-1	<u>C</u> -terminales <u>T</u> elopeptid von Kollagen I
Cyp	<u>C</u> ytochrom <u>P</u> 450
DAX	<u>d</u> osage-sensitive sex reversal, <u>a</u> drenal hypoplasia critical region, on chromosome <u>X</u> '
DBD	<u>D</u> NA- <u>B</u> inded <u>o</u> mäne
dC	<u>d</u> iaphysärer Kortex
DDT	<u>D</u> ichlor <u>d</u> iphenyl <u>t</u> richlorethan
DEHP	<u>D</u> i(2- <u>e</u> thyl <u>h</u> exyl)phthalat
DEPC	<u>D</u> iethylpyro <u>c</u> arbonat
DFG	<u>D</u> eutsche <u>F</u> orschungsgesellschaft
dL	<u>D</u> ezi <u>l</u> iter
DM	<u>D</u> iabetes <u>M</u> ellitus
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid')
dNTPs	<u>D</u> esoxy- <u>N</u> uklosid <u>t</u> riphosphate
DR	<u>D</u> irekter <u>R</u> ep <u>e</u> at

E	<u>E</u> mbryonaltag
E. coli	<u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
ED	<u>E</u> ffektiv <u>d</u> osis
EDTA	<u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etra <u>a</u> acetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<u>E</u> pidermal growth <u>f</u> actor')
EGFR	<u>E</u> GF <u>R</u> ezeptor
EIA	<u>E</u> zyme <u>I</u> mmuno <u>a</u> ssay'
ELISA	<u>E</u> zyme- <u>l</u> inked <u>I</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>A</u> ssay'
ER	<u>E</u> vertierter <u>R</u> epeat
ES	<u>E</u> longierte <u>S</u> permatiden
Esp	<u>E</u> mbryonic <u>s</u> tem cell <u>p</u> hosphatase'
ET	<u>E</u> mbryo <u>t</u> ransfer
exp	<u>e</u> xponentiell
Fa.	<u>F</u> irma
FOV	Bildausschnitt (<u>f</u> ield of <u>v</u> iew')
Fox	<u>F</u> orkhead <u>b</u> ox protein
fwd.	vorwärts (<u>f</u> or <u>w</u> ard')
F _x Generation	<u>F</u> ilial- <u>G</u> eneration
FXR	<u>F</u> arnesoid <u>X</u> <u>R</u> ezeptor
g	Erdbeschleunigung (<u>g</u> ravitational acceleration')
g	<u>G</u> ramm
G6P	<u>G</u> lukose- <u>6</u> - <u>p</u> hosphatase (Protein)
G6Pc	<u>G</u> lukose- <u>6</u> - <u>p</u> hosphatase (Gen)
GADD	<u>G</u> rowth <u>a</u> rrest and <u>D</u> N <u>A</u> - <u>d</u> amage-inducible'
GmbH	<u>G</u> esellschaft <u>m</u> it <u>b</u> eschränkter <u>H</u> aftung
GR	<u>G</u> lukokortikoid <u>r</u> ezeptor
GRIP	<u>G</u> lutamate <u>R</u> eceptor <u>I</u> nteracting <u>P</u> rotein'
GST	<u>G</u> lutathion- <u>S</u> - <u>T</u> ransferasen
GTT	<u>G</u> lukose <u>t</u> oleranz <u>t</u> est

h	Stunde (,h <u>our</u> ‘)
H3KX	Histon 3 Lysin X
HA	<u>H</u> ydroxyl <u>a</u> patit
Hb	<u>H</u> ämoglob <u>i</u> n
hCAR	<u>h</u> umanes <u>C</u> AR
HCC	Leberzell-Karzinom (,h <u>e</u> patoc <u>e</u> llular <u>c</u> arcinoma‘)
hCG	<u>h</u> umanes <u>C</u> horiongonadotropin
HCL	Salzsäure
HDAC	<u>H</u> iston- <u>D</u> eacetylase
HDL	,H <u>igh</u> <u>d</u> ensity <u>l</u> ipoprotein‘
HFD	hochkalorische Diät (,h <u>igh</u> <u>f</u> at <u>d</u> iet‘)
HIV	<u>H</u> umane <u>I</u> mmundefizienz- <u>V</u> irus
HK-Puffer	<u>H</u> artmut <u>K</u> leinert‘ Puffer
HMG-CoA	β - <u>H</u> ydroxy- β - <u>M</u> ethylglutaryl- <u>C</u> oenzym- <u>A</u>
HNF	,H <u>e</u> patocyte <u>n</u> uclear <u>f</u> actor‘
HotSHOT	, <u>H</u> ot <u>s</u> odium <u>h</u> ydroxide and <u>t</u> ris‘
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (,h <u>igh</u> <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography‘)
HSP	Hitzeschockprotein (,h <u>e</u> at <u>s</u> hock <u>p</u> rotein‘)
Hz	<u>H</u> ertz
i.p.	<u>i</u> ntraperitoneal
IDS	<u>I</u> mmundiagnostic <u>S</u> ystems
IGF	,I <u>n</u> sulin-like <u>g</u> rowth <u>f</u> actor‘
IMB	<u>I</u> nstitut für <u>M</u> olekulare <u>B</u> iologie
Inc.	, <u>I</u> ncorporated‘
IR	<u>I</u> nvertierter <u>R</u> epet
IVF	<u>I</u> n- <u>v</u> itro <u>F</u> ertilisation
kb	<u>K</u> ilob <u>a</u> sen
kg	<u>K</u> ilogramm

KGaA	<u>K</u> ommanditgesellschaft auf <u>A</u> ktien
KHK	<u>K</u> oronare <u>H</u> erz <u>k</u> rankheit
KO	, <u>K</u> nock- <u>o</u> ut‘
kVp	Röhrenspannung
L	<u>L</u> iter
LBD	<u>L</u> iganden <u>b</u> inde <u>d</u> omäne
LD	<u>L</u> etale <u>D</u> osis
LDL	, <u>L</u> ow <u>d</u> ensity <u>l</u> ipoprotein‘
log	<u>l</u> ogarithmisch
LogP	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
LPL	<u>L</u> ipoprotein <u>l</u> ipase
LXR	<u>L</u> eber- <u>X</u> - <u>R</u> ezeptor
m	<u>M</u> eter
m	<u>M</u> ännlich
M	<u>M</u> olarität
m ²	Quadratmeter
mA	<u>M</u> illiampere
max.	<u>m</u> aximal
mCAR	<u>m</u> urines <u>C</u> AR
Mdm	, <u>M</u> ouse <u>d</u> ouble <u>m</u> inute‘
MDR	, <u>M</u> ultidrug- <u>R</u> esistance-Protein‘
mg	<u>M</u> illigramm
min	<u>M</u> inuten
Mio	<u>M</u> illion
ml	<u>M</u> illiliter
mM	<u>M</u> illimolar
mm	<u>M</u> illimeter
mm10	Murines Genom Nr. 10 (, <u>m</u> us <u>m</u> usculus No. <u>10</u> ‘)
MOIN CC	<u>M</u> olecular <u>I</u> maging <u>N</u> orth <u>C</u> ompetence <u>C</u> enter

mRNA	<u>M</u> essenger <u>R</u> NA
MRP	, <u>M</u> ultidrug <u>r</u> esistance-associated <u>p</u> roteins'
MS	<u>M</u> assens <u>s</u> pektrometrie
MzM	<u>M</u> aiskeimöl zu <u>M</u> aiskeimöl
MzT	<u>M</u> aiskeimöl zu <u>T</u> CPOBOP
n	Stichprobenumfang
N	<u>N</u> ormalität
NADPH	<u>N</u> icotinamid <u>a</u> denin <u>d</u> inukleotid <u>p</u> hosphat
NAT	<u>N</u> - <u>A</u> cetyl <u>t</u> ransferasen
NCBI	, <u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> iot <u>e</u> chnology <u>I</u> nformation'
NCoR	, <u>n</u> uclear receptor <u>co</u> - <u>r</u> epressor'
ncRNA	<u>n</u> icht <u>co</u> dierende <u>R</u> NA
ng	<u>N</u> anogramm
nm	<u>N</u> anometer
NR	<u>N</u> ukleärer <u>R</u> ezeptor
ns	<u>n</u> icht <u>s</u> ignifikant
Ø	Durchschnitt
OAT	Organischer Anionentransporter (' <u>o</u> rganic <u>a</u> nion <u>t</u> ransporter')
OATP	Organische Anionen Transporer Familie ('organic anion transporting family')
OCT	Organischer Kationentransporter (' <u>o</u> rganic <u>c</u> ation <u>t</u> ransporter')
p.o.	<u>p</u> er <u>o</u> s
P1NP	<u>N</u> -terminales <u>P</u> ropeptid von Kollagen I
PAS	<u>P</u> er- <u>A</u> rnt- <u>S</u> im-Domäne (Per: ,period circadian protein'; Arnt ,aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein'; Sim: ,single-minded protein')
PB	<u>P</u> henob <u>a</u> rbital
PBREM	, <u>p</u> henob <u>a</u> rbital- <u>r</u> esponsive <u>e</u> nhancer <u>m</u> odule'
PBS	Phosphate-gepufferte Salzlösung (, <u>P</u> hosphate- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline')
PCB	<u>P</u> olychlorierte <u>B</u> iphenyle

PCDD	Dioxine
PCDF	Furane
Pck1	<u>P</u> hosphoenolpyruvat <u>c</u> arboxy <u>k</u> inase (Gen)
PCR	Polymerasekettenreaktion (' <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction')
PEEK	<u>P</u> oly <u>e</u> ther <u>e</u> ther <u>k</u> eton
PEPCK	<u>P</u> hosphoenolpyruvat <u>c</u> arboxy <u>k</u> inase (Protein)
PGC	<u>P</u> eroxisome proliferator-activated receptor <u>g</u> amma <u>c</u> oactivator'
pgCAR	Schweine-CAR (,pig <u>C</u> AR')
P-gp	<u>P</u> - <u>G</u> lykoprotein
pH	Wasserstoffionen-Aktivität (' <u>p</u> otentia <u>h</u> ydrogenii')
PLC	, <u>P</u> ublic <u>L</u> imited <u>C</u> ompany'
PMSG	Pferde Choriongonadotropin (' <u>p</u> regnant <u>m</u> are's <u>s</u> erum gonadotropin')
POP	Persistierende Organische Schadstoffe (' <u>p</u> ersitent <u>o</u> rganic <u>p</u> ollutants')
PP	<u>P</u> roteinphosphatase
Ppar	<u>P</u> eroxisom- <u>P</u> roliferator- <u>a</u> ktivierte <u>R</u> ezeptoren
ppm	Teile pro Million (' <u>p</u> arts <u>p</u> er <u>m</u> illion')
psi	Pfund pro Quadrat Zoll (' <u>p</u> ound per <u>s</u> quare <u>i</u> nch')
PVDF	<u>P</u> oly <u>v</u> inylid <u>e</u> ndifluorid
PXR	<u>P</u> regnan- <u>X</u> - <u>R</u> ezeptor
qRT PCR	quantitative Echtzeit PCR (quantitative <u>r</u> eal <u>t</u> ime <u>P</u> CR)
RAC	,Ras-related C3 botulinum toxin substrate'
RANK	, <u>R</u> eceptor <u>A</u> ctivator of <u>NF-κB</u> '
RANKL	, <u>R</u> eceptor <u>A</u> ctivator of <u>NF-κB</u> <u>L</u> igand'
rev.	rückwärts (,reverse')
RIPA	, <u>R</u> adio <u>i</u> mmunoprecipitation <u>a</u> ssay'
RNA	Ribonukleinsäure (,ribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid')
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies (,Reactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies')

rpm	Runden pro Minute (,r <u>o</u> unds p <u>e</u> r <u>m</u> inute‘)
rRNA	<u>r</u> ibosomale <u>R</u> NA
RS	<u>R</u> unde <u>S</u> permatiden
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
RXR	<u>R</u> etinoid <u>X</u> <u>R</u> ezeptor
S	<u>S</u> pongiosa
s	<u>S</u> ekunde
s.c.	<u>s</u> ub <u>c</u> utan
SAS	Vereinfachte Aktiengesellschaft (,S <u>o</u> ciété par <u>a</u> ctions <u>s</u> implifiée‘)
SD	<u>S</u> tandard <u>d</u> iät
SDS	Natriumdodecylsulfat (,s <u>o</u> dium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate‘)
sek	<u>S</u> ekunde
Ser	<u>S</u> erin
SHP	,s <u>m</u> all <u>h</u> eterodimer <u>p</u> artner‘
SLC	,S <u>o</u> lute- <u>C</u> arrier‘
SMC	,S <u>tr</u> uctural <u>M</u> aintenance of <u>C</u> hromosomes‘
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (,S <u>i</u> ngle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism‘)
SOD	<u>S</u> uperoxid- <u>D</u> ismutase
Sp	,s <u>p</u> ecificity <u>p</u> rotein‘
SPCs	Spermatozyten (,primary <u>s</u> permatoc <u>y</u> tes‘)
SRC	,s <u>t</u> eroid <u>r</u> eceptor <u>c</u> oactivator‘
Srebf1	,S <u>t</u> erol <u>r</u> egulatory <u>e</u> lement- <u>b</u> inding transcription <u>f</u> actor‘
SRY	Geschlechtsbestimmende Region des Y-Chromosoms (,S <u>e</u> x determining <u>r</u> egion of <u>Y</u> -Gen‘)
SSCs	Spermatogonien (,s <u>p</u> ermatogonial <u>s</u> tem <u>c</u> ells‘)
ST	<u>S</u> ulfo <u>t</u> ransferasen
SULT	<u>S</u> ulfo <u>t</u> ransferasen
SV	<u>S</u> plice <u>v</u> arianten
Tab.	<u>T</u> abelle

TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> acetat- <u>E</u> DTA
Taq	<u>T</u> hermus <u>A</u> quaticus Polymerase
TARC	, <u>T</u> ranslational <u>A</u> nimal <u>R</u> esearch <u>C</u> enter‘
Tb.Sp	Trabekuläre Abstände (,trabecular spacing‘)
Tb.Th	trabekuläre Dicke (,trabecular thickness‘)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (,Tris-buffered saline‘)
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20 (,Tris-buffered saline with Tween20‘)
TCDD	2,3,7,8- <u>T</u> etrachlordibenzodioxin
TCPOBOP	1,4-Bis-[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene
TEMED	<u>T</u> etramethylethylendiamin
Thr	<u>T</u> hreonin
TierSchVersV	<u>T</u> ierschutz- <u>V</u> ersuchstierverordnung
TIF	,transcriptional mediators/intermediary factor‘
TMD	spezifische Dichte des mineralisierten Gewebes (,tissue mineral density‘)
TR	<u>T</u> hyroid- <u>R</u> ezeptor
TRAM	,translocation associated membrane protein‘
TRE	<u>T</u> hyroid- <u>R</u> ezeptor <u>E</u> rkennungssequenz
Tris	<u>T</u> ris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSH	<u>T</u> hyreoidea- <u>s</u> timulierendes <u>H</u> ormon
TSS	Transkriptionsstart (,transcription starting site‘)
TzM	<u>T</u> CPOBOP zu <u>M</u> aiskeimöl
TzT	<u>T</u> CPOBOP zu <u>T</u> CPOBOP
UGT	<u>U</u> DP- <u>G</u> lucuronosyltransferase
UHQ	<u>U</u> ltra <u>h</u> ohe <u>Q</u> ualität
UK	Vereinigtes Königreich (,United Kingdom‘)
UKSH	<u>U</u> niversitätsklinikum <u>S</u> chleswig- <u>H</u> olstein
UNEP	Umweltprogramm der Vereinten Nationen (,United Nations Environment Programm‘)

US	Vereinigte Staaten von Amerika (,United States')
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (,United States of America')
UV	Ultraviolette Licht
UV-VIS	UV- und sichtbares (,visible') Licht
V	Version
V	Volt
vC	vertebraler Kortex
VDR	Vitamin D Rezeptor
vgl.	vergleiche
VLDL	,Very low density lipoprotein'
vs.	Versus
w	Weiblich
w/v	Gewicht pro Volumen (,weight per volume')
WHO	Weltgesundheitsorganisation (,World Health Organization')
XREM	,xenobiotic-responsive enhancer module'
z.B.	zum Beispiel

A2 Programme, Online-Tools und Datenbanken

Programm / Online Tool / Datenbank	Anbieter / Internetadresse
IDT OligoAnalyzer 3.1	https://eu.idtdna.com/calc/analyzer
Oligo Calc	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoCalc.html
NCBI BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Reverse Complement	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
StepOne Software V 2.3	Life Technologies Corporation Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA
UCSC BLAT	https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat
UCSC Genome Browser	https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway
UCSC In-Silico PCR	https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr
NCBI Gene	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/
Magellan™ V 6.4	Tecan Group Ltd. Männedorf, Schweiz
Quantity One® V 4.6.9	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Image Lab V 4.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
MassHunter Version B.05.02	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn
SCANCO Software Suite V 6.5-3	SCANCO Medical AG, Brüttisellen Schweiz
StructuralInsight V 3.1.6.1	Sektion Biomedizinische Bildgebung, UKSH Kiel
GraphPad Prism V 5.04	Graphpad, San Diego USA
Genomatix Genome Analyzer V 3.40820	Genomatix GmbH, München
NHR-Scan	http://www.cisreg.ca/cgi-bin/NHR-scan/nhr_scan.cgi

A3 Zusatzmaterial

Tab. A 1: Übersicht der Phänotypen von CAR bzw. PXR Einzel- und Doppel-KnockOuts sowie humanisierten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp
Angaben beruhen auf Literaturrecherchen in PubMed

	CAR / PXR	CAR^{-/-} / PXR	CAR / PXR^{-/-}	CAR^{-/-} / PXR^{-/-}	hCAR / hPXR
Äußerer Phänotyp, Fruchtbarkeit	normal	Lebensfähig, fertil, normale Lebenserwartung, kein nach außen erkennlicher Phänotyp			
Knochenstruktur	normal	erhöhte BMD (in Männchen)	erhöhte alterungsbedigte Gelenknorpelermüdung; verminderte BMD (in Weibchen)	<i>bislang nicht untersucht</i>	<i>bislang nicht untersucht</i>
Sonstiges		diskrete neuronale Fehlbildungen, EEG-Veränderungen und Verhaltensauffälligkeiten; erhöhte Anfälligkeit gegenüber Neurotoxinen wie Kainsäure	erhöhte Expression einiger NF-kB Targetgene (PXR suppremiert NF-kB)		Geringfügige Unterschiede im Leber-Transkriptom
Hepatische Cytochrom P450 Enzyme					
Basal-Expression	normal	Cyp2b10 und Cyp2b9 vermindert	Cyp3a11 leicht erhöht (PXR inhibiert CAR ligandenunabhängig [*])	Cyp2b10 und Cyp2b9 vermindert	Cyp2b10 in hCAR bzw. Cyp3a11 in hPXR Mäusen leicht erhöht
Induzierbarkeit	Cyp3a11-Induktion durch PCN Cyp2b10-Induktion durch TCPOBOP	keine Cyp2b10-Induktion durch TCPOBOP normale Cyp3a11-Induktion durch PCN	keine Cyp3a11-Induktion durch PCN normale Cyp2b10-Induktion durch TCPOBOP	keine Cyp3a11-Induktion durch PCN keine Cyp2b10-Induktion durch TCPOBOP	keine Cyp3a11-Induktion durch PCN keine Cyp2b10-Induktion durch TCPOBOP (verschobenes Ligandenspektrum)

Endotoxin-Sensitivität					
Lebertoxizität von Gallensäuren [LCA]	geringfügig	mäßig	geringfügig	massiv	<i>bislang nicht untersucht</i>
Bilirubin-Detoxifizierung	basal normal, Hyperbilirubinämie durch PB thearpierbar	basal normal, Hyperbilirubinämie nicht durch PB therapierbar	basal erhöht [*] Hyperbilirubinämie durch PB thearpierbar	basal normal, Hyperbilirubinämie nicht durch PB therapierbar	basal normal, Hyperbilirubinämie durch PB thearpierbar
Xenobiotika-Sensitivität					
PB vermittelte hepatozelluläre Hypertrophie	ja	nein	ja	nein	ja (leicht erhöht)
Acetaminophen vermittelte Hepatotoxizität	ja	nein	ja	nein	ja (erhöht)
PB vermittelte HCC Bildung	ja	nein	ja	nein	ja (vermindert)

Quellen: (Aleksunes und Klaassen 2012, Azuma *et al.* 2010, Azuma *et al.* 2015, Boussadia *et al.* 2016, Braeuning *et al.* 2014, Cho *et al.* 2014, Scheer *et al.* 2008, Tien *et al.* 2007, Uppal *et al.* 2005, Xie 2009, Zhang *et al.* 2004)

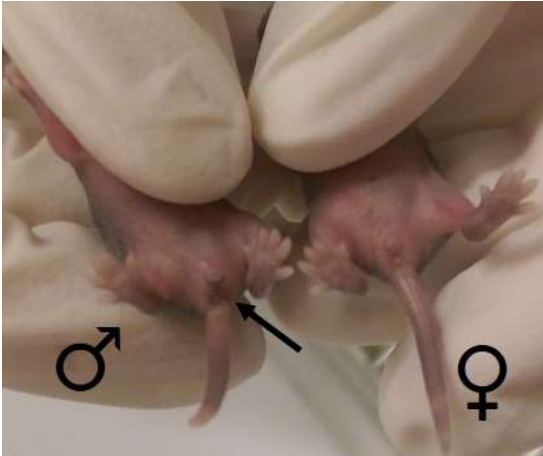


Abb. A 1: Geschlechtsbestimmung bei neugeborenen C57BL/6 Mäusen

Die Geschlechtsbestimmung anhand des anogenitalen Abstands wird bei C57BL/6 J Jungtieren durch einen nur männlichen Tieren vorhandenen dunkler Pigmentfleck erleichtert, welcher sich dort findet, wo später die Hoden einwachsen.

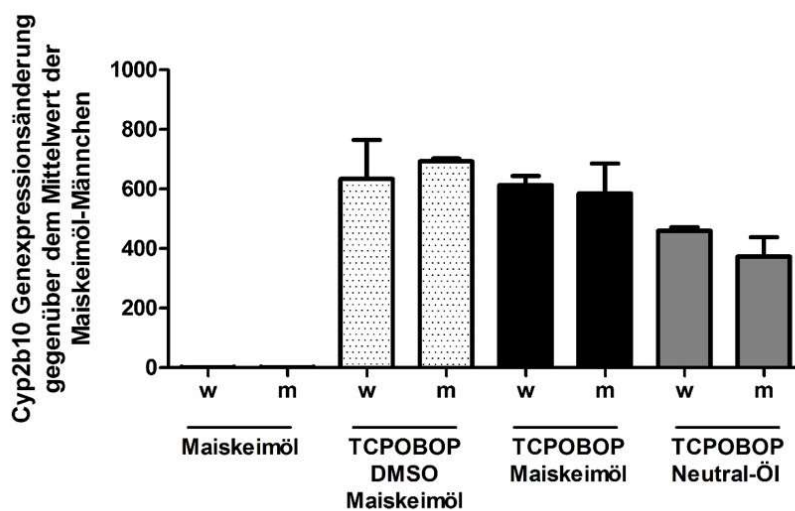


Abb. A 2: Hepatische Cyp2b10-Expression nach Applikation von TCPOBOP in verschiedenen Lösungsmitteln

Zehn Wochen alte weiblichen C57BL/6 Mäuse wurden einmalig mit TCPOBOP (3 mg/kg) gelöst in DMSO/Maiskeimöl (10/90), Maiskeimöl, oder Neutralöl (Mittelkettige Triglyceride, #700282, Euro OTC Pharma GmbH Bönen) oder als Kontrolle mit purem Maiskeimöl behandelt und 14 Tage später verpaart. Die hepatische Cyp2b10 mRNA Expression der sechs Tage alten Jungtiere wurde mittels TaqMan und $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode ermittelt. Dargestellt sind die Genexpressionsänderungen gegenüber dem Mittelwert der Nachkommen der Maiskeimölkontrolle (Mittelwert mit Standardfehler); auf Grund der teilweise sehr kleinen Gruppengrößen (n=2-11) erfolgten keine statistischen Analysen.

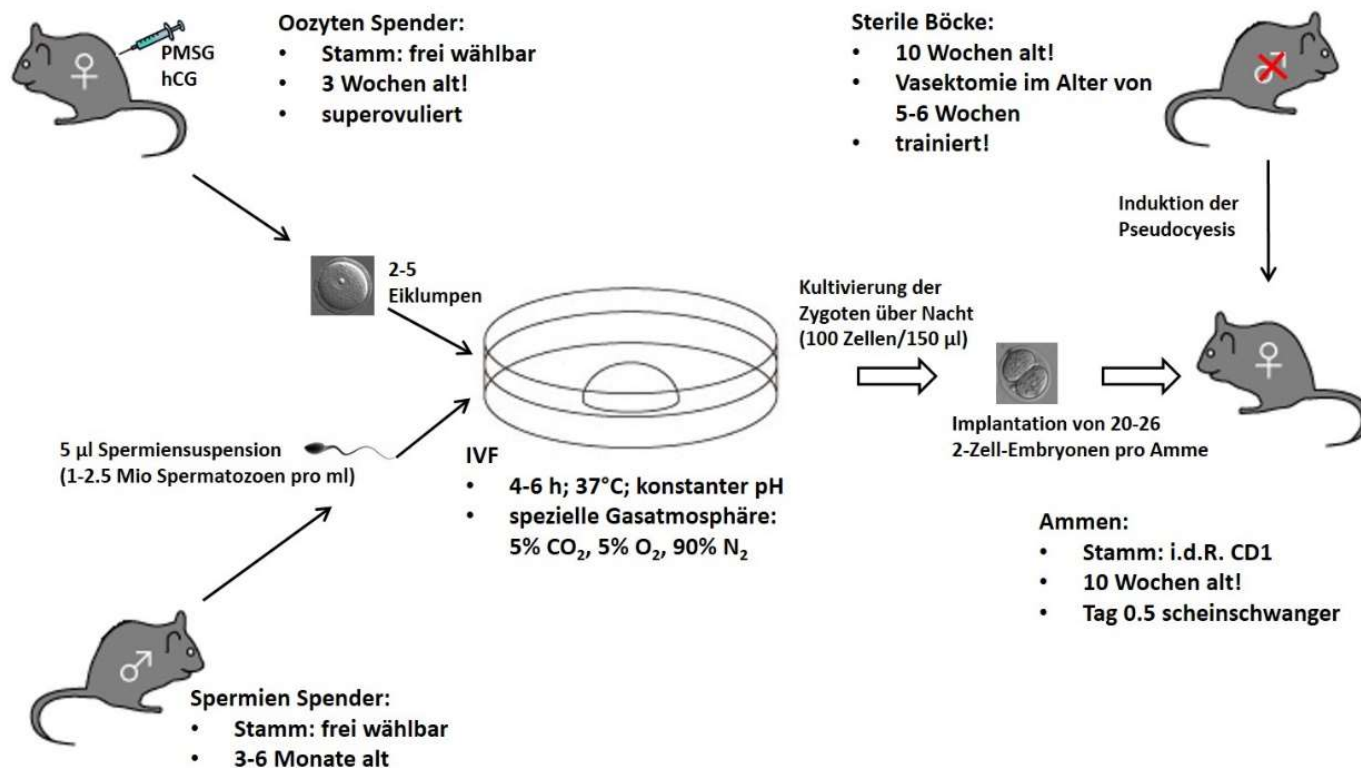


Abb. A 3: Schematische Darstellung des experimentellen Vorgehens bei einer in-vitro-Fertilisation

Für eine in-vitro-Fertilisation muss zunächst in 21 Tage alten Weibchen durch Injektion von PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin; 2,5-5 IU; i.p.) und hCG (human Chorion Gonadotropin; 2,5 IU; i.p.) in steriler physiologischer Kochsalz-Injektionslösung im Abstand von 48 h eine Superovulation eingeleitet werden, bevor 13 h später die Eizellen gewonnen werden können. Dafür müssen die Tiere getötet und Ovarien, Ovidukte sowie Teile des Uterus heraus präpariert werden, um unter mikroskopischer Kontrolle die Cumulus-Oozyten-Komplexe durch Ruptur der Eileiterampullen zu isolieren. Parallel sollte die Spermengewinnung aus drei bis sechs Monate alten Böcken erfolgen, deren Nebenhoden (Cauda Epididymis) und Samenleiter (Vas Deferens) postmortal präpariert und in 500 µl Cook MVF Medium (Cook Medical Inc., Bloomington USA) eröffnet werden, so dass die Spermien während der nachfolgenden Inkubation (10 min, 37°C) ausschwimmen können. Für die eigentliche in-vitro-Fertilisation sollten anschließend 2-5 Cumulus-Oozyten-Komplexe und 5 µl Sperma-Suspension (~2*10⁶ Spermien pro ml) in 500 µl Cook K-RVFE-50 Medium (Cook Medical Inc., Bloomington USA) bei 37°C und stabilen pH-Bedingungen für 4-6 h inkubiert werden. Die resultierenden Zygoten müssen mehrfach gewaschen, aufgeteilt (~100 Zellen in 150 µl Medium) und über Nacht bei 37°C kultiviert werden. Am darauffolgenden Tag können die lebensfähigen 2-Zell-Embryonen isoliert und operativ (unter Narkose), durch transiente Auslagerung von Uterus und Ovidukt, in die Eileiter von Tag 0,5 scheinchwangeren Leihmüttern eingebracht werden (20 - 26 pro Amme).

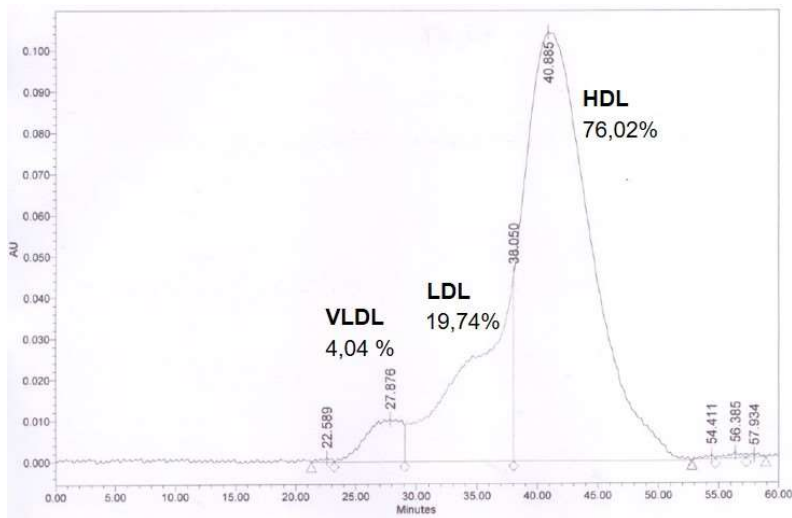


Abb. A 4: Bestimmung von Serumcholesterinen per HPLC-Größenausschlusschromatographie

Die von Prof. Dr. E. B. (Institut für experimentelle Biomedizin des Universitätsklinikums Würzburg) durchgeführte Analyse des Serumlipidprofils mittels Größenausschlusschromatographie beruht auf einer UV-basierten kolorimetrischen Messung der Cholesterole in Kombination mit einer Fraktionierung durch HPLC. Die Konzentrationen von VLDL, LDL und HDL können danach - basierend auf dem per UV-Adsorption ermittelten Gesamtcholesterin - aus dem integrierten Chromatogramm anhand des prozentualen Flächenanteils der charakteristischen Peaks berechnet werden. Für eine möglichst genaue Analyse sollte die Trennung der Peaks nicht im Tal zwischen den Peaks sondern nach Gauss'scher Ableitung am Wendepunkt vorgenommen werden.

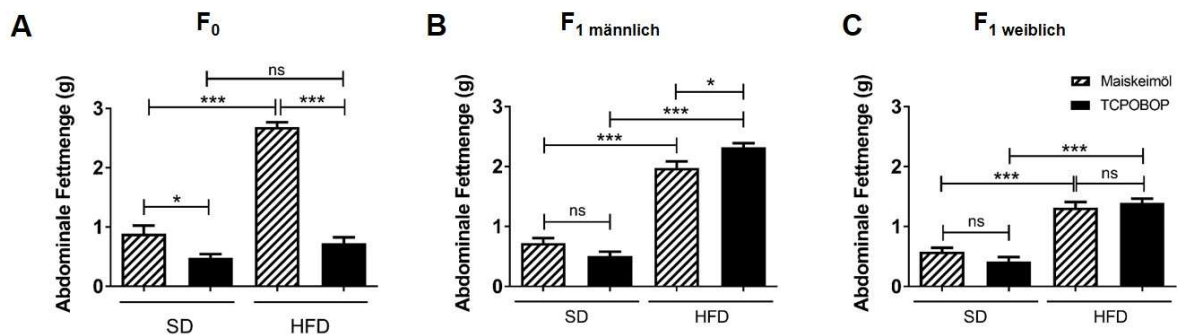


Abb. A 5: Abdominale Fettmenge von TCPOBOP vorbehandelten Mäusen und ihren Nachkommen unter hoch-kalorischer Diät

Unterschiede in der abdominalen Fettmenge nach einer neunwöchigen hochkalorischer Diät (HFD) im Vergleich zur Standarddiät (SD) (A) Männliche F₀ Mäuse, die im Alter von 6 Wochen unmittelbar vor der Futterumstellung mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl injiziert wurden (B+C) 15 Wochen alte männliche (B) und weibliche (C) Nachkommen (F₁) weiblicher Mäuse, die im Alter von 9 Wochen mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl injiziert und eine Woche danach mit unbehandelten Böcken verpaart wurden; dargestellt ist die Menge (g) abdominalen Fetts, welche durch Präparation und Wiegen der beiden großen abdominalen Fettlappen ermittelt wurde (Mittelwert mit Standardfehler; F₀ n=7-8; F₁ männlich n=9; F₁ weiblich n=6-11). Statistisch signifikante Unterschiede wurden abhängig vom Ergebnis eines Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung paarweise mittels t-test bzw. Mann-Whitney-Test ermittelt und mit Sternchen gekennzeichnet (*, p<0,05; **, p<0,01, ***, p<0,001).

Tab. A 2: Gegenüberstellung der für Cyp2b10 mittels RNASeq, TaqMan und Westernblot ermittelten Genexpressionsänderungen

Der den Daten zugrunde liegende Tierversuch, sowie die RNASeq- und TaqMan-Analysen wurden von Frau Dr. Marianne Mathäs im Rahmen ihrer Promotion (2014) durchgeführt. Hochdurchsatzsequenzierung, TaqMan-Analysen und Westernblots wurden mit Leberproben derselben Tiere durchgeführt.

RNASeq															
Werte gegenüber der direkten DMSO-Kontrolle des eigenen Geschlechts															
TCPOBOP								PCN							
F0 KZ		F0 LZ		F1 KZ		F1 LZ		F0 KZ		F0 LZ		F1 KZ		F1 LZ	
Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen
	2150-fach ↑		29-fach ↑		156,26-fach ↑		4,63-fach ↑		95,81-fach ↑		2-fach ↓		1-fach ↓		1-fach ↓
FPKM-Werte				FPKM-Werte				FPKM-Werte				FPKM-Werte			
0,68 → 1471,75		2,32 → 66,98		0,45 → 69,92		1,30 → 6,03		0,71 → 67,58		2,33 → 1,14		0,46 → 0,53		1,25 → 1,47	

qPCR/Taqman Einzelproben															
Werte gegenüber der direkten DMSO-Kontrolle des eigenen Geschlechts															
TCPOBOP								PCN							
F0 KZ		F0 LZ		F1 KZ		F1 LZ		F0 KZ		F0 LZ		F1 KZ		F1 LZ	
Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen
3363-fach ↑	1286-fach ↑	6-fach ↑	31-fach ↑		120-fach ↑	2-fach ↑	10-fach ↑	140-fach ↑	45-fach ↑	1-fach ↓	1-fach ↓		1-fach ↓	1-fach ↓	1-fach ↓
F0 KZ Adult-Injekt				F1 KZ Adult-Injekt				F0 KZ Adult-Injekt				F0 LZ Adult-Injekt			
Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen			Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen				
177-fach ↑	5616-fach ↑	40-fach ↑	298-fach ↑	1230-fach ↑	701-fach ↑			5-fach ↑	12-fach ↑	1-fach ↓	1-fach ↓				

Werte gegenüber mean male DMSO															
TCPOBOP								PCN							
F0 KZ		F0 LZ		F1 KZ		F1 LZ		F0 KZ		F0 LZ		F1 KZ		F1 LZ	
Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen
1416-fach ↑	1286-fach ↑	100-fach ↑	31-fach ↑	92-fach ↑	120-fach ↑	62-fach ↑	10-fach ↑	59-fach ↑	45-fach ↑	16-fach ~	1-fach ↓	1-fach ↓	1-fach ↓	35-fach ~	1-fach ↓
F0 KZ Adult-Injekt				F1 KZ Adult-Injekt				F0 KZ Adult-Injekt				F0 LZ Adult-Injekt			
Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen			Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen				
6155-fach ↑	5616-fach ↑	738-fach ↑	298-fach ↑	914-fach ↑	701-fach ↑			164-fach ↑	12-fach ↑	11-fach ~	1-fach ↓				

Westernblot															
Werte gegenüber der direkten DMSO-Kontrolle des eigenen Geschlechts															
TCPOBOP								PCN							
F0 KZ		F0 LZ		F1 KZ		F1 LZ		F0 KZ		F0 LZ		F1 KZ		F1 LZ	
Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen
32-fach ↑	26-fach ↑ (gegen female)	2-fach ↑	3-fach ↑		4-fach ↑	1,5-fach ↓	2-fach ↑	1-fach ↓	1-fach ↓ (gegen female)	1-fach ↓	1-fach ↓		1-fach ↓	1-fach ↓	1-fach ↓
F0 KZ Adult-Injekt				F1 KZ Adult-Injekt				F0 KZ Adult-Injekt				F0 LZ Adult-Injekt			
Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen			Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen				
26-fach ↑	40-fach ↑	19-fach ↑	58-fach ↑	20-fach ↑	35-fach ↑			1-fach ↓	1-fach ↓	1-fach ↓	1-fach ↓				

Werte gegenüber mean male DMSO															
TCPOBOP								PCN							
F0 KZ		F0 LZ		F1 KZ		F1 LZ		F0 KZ		F0 LZ		F1 KZ		F1 LZ	
Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen
		9-fach ↑	3-fach ↑	5-fach ↑	4-fach ↑	1-fach ↓	2-fach ↑			2-fach ~	1-fach ↓	1,5-fach ↓	1-fach ↓	1-fach ↓	1-fach ↓
F0 KZ Adult-Injekt				F1 KZ Adult-Injekt				F0 KZ Adult-Injekt				F0 LZ Adult-Injekt			
Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen			Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen				
40-fach ↑	40-fach ↑	75-fach ↑	58-fach ↑	18-fach ↑	35-fach ↑			2-fach ↑	1-fach ↓	4-fach ~	1-fach ↓				

- ↑ hochreguliert
- ↓ runterreguliert
- ↔ Expression unverändert
- ~ Expressionsunterschiede ausschließlich geschlechtsbedingt

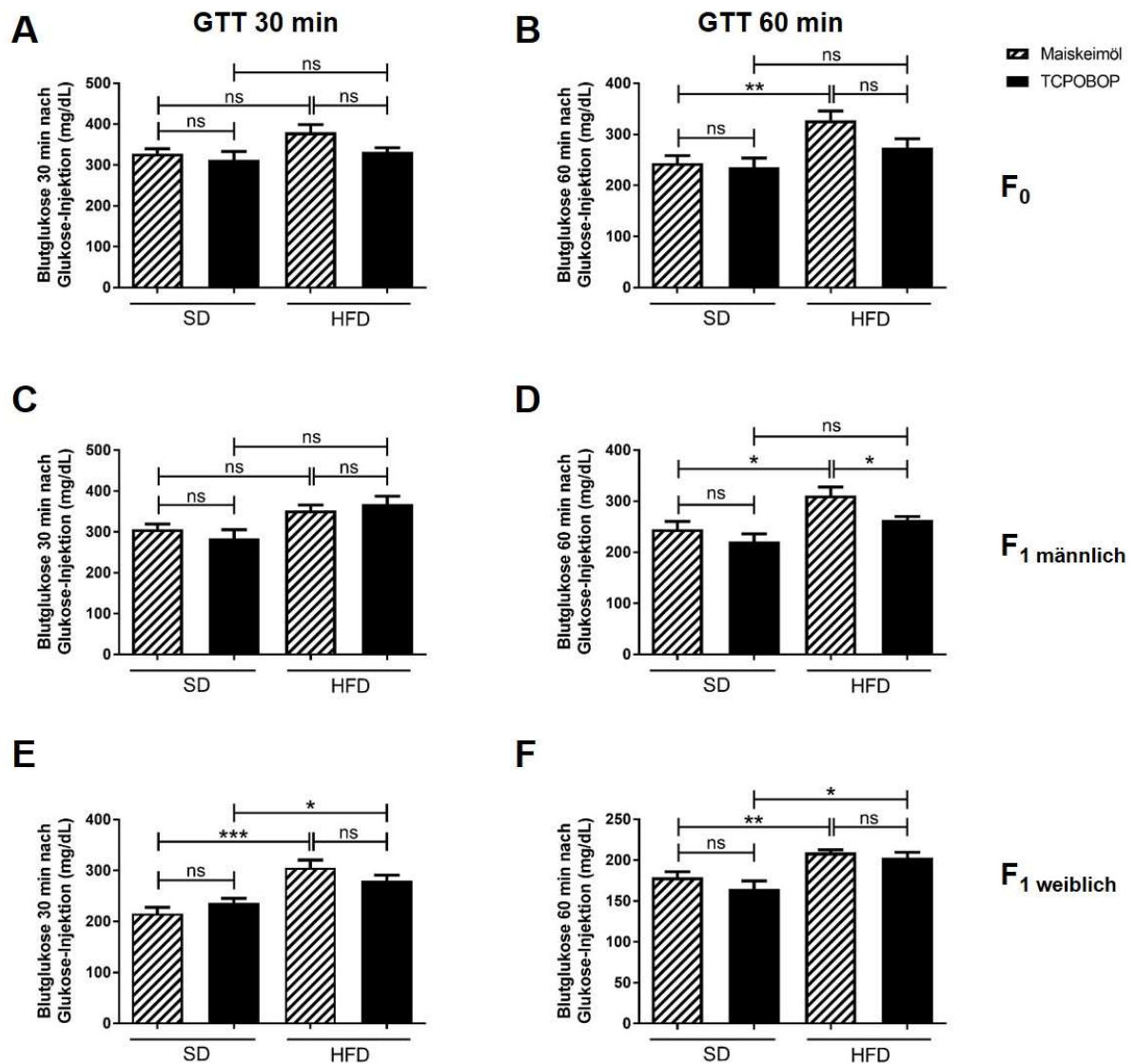


Abb. A 6: Glukosetoleranztests (GTTs) TCPOBOP vorbehandelter Mäuse und ihrer Nachkommen – punktuelle Analysen des Blutglukosemaximums (30 min) und der Geschwindigkeit des stoffwechselvermittelten Rückgangs (60 min)

Blutglukose Messungen über Nacht gefasteter Mäuse 30 min (A, C, E) bzw. 60 min (B, D, F) nach Injektion eines Bolus 10%iger Glukoselösung (2g/kg - berechnet anhand des geschlechtsspezifischen Durchschnittsgewichts der SD Tiere). Die Messungen erfolgten in Doppelwerten mit dem CONTOUR® XT Blutzuckermessgerät; (A+B) Männliche F₀ Mäuse, die im Alter von sechs Wochen mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl injiziert und nachfolgend für neun Wochen ad libitum mit einer normalkalorischen Standarddiät (SD) oder einer hochkalorischen Diät (HFD) gefüttert wurden (C-F) Männliche (C+D) und weibliche (E+F) Nachkommen (F₁) präkonzeptionell mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl injizierter Weibchen, die ab der sechsten Lebenswoche für neun Wochen ad libitum mit einer normalkalorischen Standarddiät (SD) oder einer hochkalorischen Diät (HFD) gefüttert wurden; Dargestellt ist die durchschnittliche Blutglukosekonzentration (mg/dL) (Gruppenmittelwert mit Standardfehler; F₀ n=7-8; F₁ männlich n=9; F₁ weiblich n=6-11). Statistisch signifikante Unterschiede wurden abhängig vom Ergebnis eines Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung paarweise mittels t-test bzw. Mann-Whitney-Test ermittelt und nach manueller Bonferroni-Korrektur gegen die Anzahl der im Experiment untersuchten Zeitpunkte (3; basal [vgl. Abb. 15], 30 min, 60 min) mit Sternchen gekennzeichnet (*, p<0,05, **, p<0,01, ***, p<0,001).

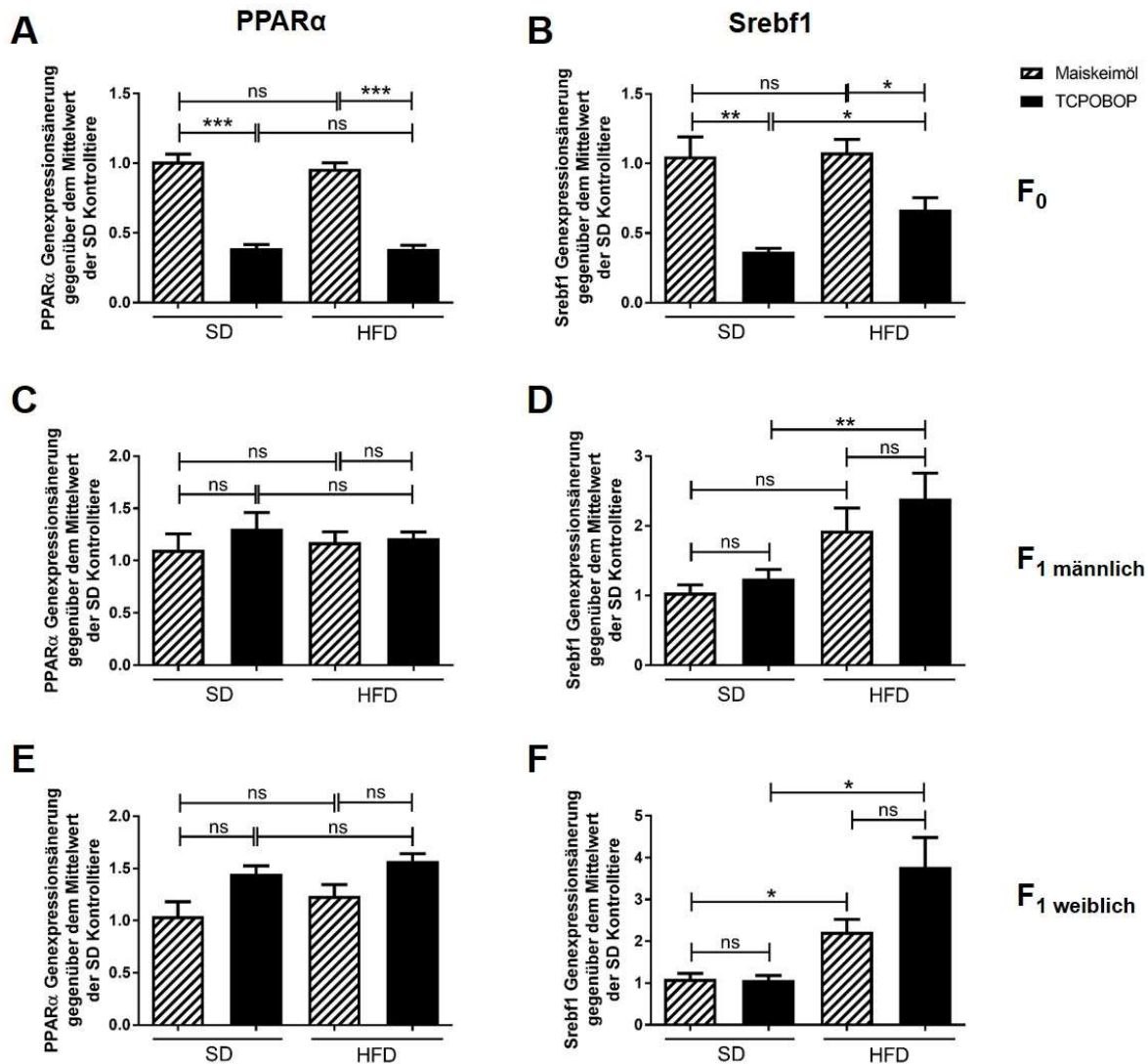


Abb. A 7: Expressionsanalysen der Fettstoffwechsel-Regulatoren PPAR α und Srebf1 in der Leber mit TCPOBOP vorbehandelter Mäuse und ihrer Nachkommen

Hepatische Genexpressionsanalysen von (A+B) männlichen F₀ Mäusen, die im Alter von sechs Wochen mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl injiziert und nachfolgend für neun Wochen ad libitum mit einer normalkalorischen Standarddiät (SD) oder einer hochkalorischen Diät (HFD) gefüttert wurden sowie (C-F) männlichen (C+D) und weiblichen (E+F) Nachkommen (F₁) präkonzeptionell mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl injizierter Weibchen, die ab der sechsten Lebenswoche für neun Wochen ad libitum mit einer normalkalorischen Standarddiät (SD) oder einer hochkalorischen Diät (HFD) gefüttert wurden; Die hepatische PPAR α und Srebf1 mRNA Expression wurde mittels SYBR qPCR und $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode ermittelt. Dargestellt sind die Genexpressionsänderungen gegenüber dem Mittelwert der mit Standarddiät gefütterten Tiere der Lösungsmittelkontrolle (Mittelwert mit Standardfehler; F₀ n=7-8; F₁ männlich n=9; F₁ weiblich n=6-11). Statistisch signifikante Unterschiede wurden abhängig vom Ergebnis eines Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung paarweise mittels t-test bzw. Mann-Whitney-Test ermittelt und nach manueller Bonferroni-Korrektur gegen die Anzahl der im Experiment untersuchten Gene (5; G6Pc, Pck1, Ppar α , Srebf1, ApoA1) mit Sternchen gekennzeichnet (*, p<0,01, ***, p<0,001). Abbildung erstellt basierend auf Daten erhoben in Kooperation mit L. R.

Tab. A 3: Induktionswerte von Cyp2b10, Cyp3a11 und Cyp2c29 in Abhängigkeit von der applizierten TCPOBOP Dosis

Hepatische Genexpressionsanalysen von acht Wochen alten männlichen Mäusen, die mit TCPOBOP (3 µg/kg, 6 µg/kg, 30 µg/kg, 600 µg/kg oder 3000 µg/kg i.p. in Maiskeimöl) behandelt wurden. Die mRNA Expression wurde nach 3 Tagen mittels TaqMan® (Cyp2b10, Cyp3a11) bzw. SYBR-Green q RT PCR (Cyp2c29) und $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode ermittelt. Die in der Tabelle dargestellten Zahlenwerte beschreiben für die drei untersuchten Gene dosisabhängig die durchschnittliche (n=4) Genexpressionsänderung gegenüber dem Mittelwert der Lösungsmittelkontrolle.

	3 µg/kg	6 µg/kg	30 µg/kg	300 µg/kg	600 µg/kg	3000 µg/kg
Cyp2b10	6-fach	13-fach	224-fach	3500-fach	3900-fach	6900-fach
Cyp3a11	1,3-fach	1,2-fach	2,3-fach	3,6-fach	3,4-fach	9,3-fach
Cyp2c29	1,3-fach	1,9-fach	5-fach	11-fach	8,4-fach	19,5-fach

**Abb. A 8: Vergleich der TCPOBOP-vermittelten unmittelbaren, anhaltenden und generationsübergreifenden Cyp2b10-Induktion in C57BL/6 und CD1 Mäusen**

(A) Schematische Darstellung des experimentellen Designs. Adulte weibliche Mäuse beider Stämme wurden einmalig mit TCPOBOP (3mg/kg i.p. in DMSO/Maiskeimöl [10/90]) behandelt. Die hepatische Cyp2b10-mRNA Expression wurde in F₀ Mäusen nach 3 Tagen, nach 3 Monaten und in den Nachkommen weiblicher F₀ Tiere (verpaart mit unbehandelten Böcken) im Alter von 6 Tagen mittels TaqMan® und $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode ermittelt. (B) Dargestellt ist der tabellarische Vergleich der in den Mausstämmen detektierten Genexpressionsänderungen gegenüber dem Mittelwert der der Lösungsmittelkontrolle (Mittelwert mit Standardfehler). Die C57BL/6 Daten stammen aus Experimenten von Frau Dr. Marianne Mathäs (vgl. 1.7 Abb. 4).

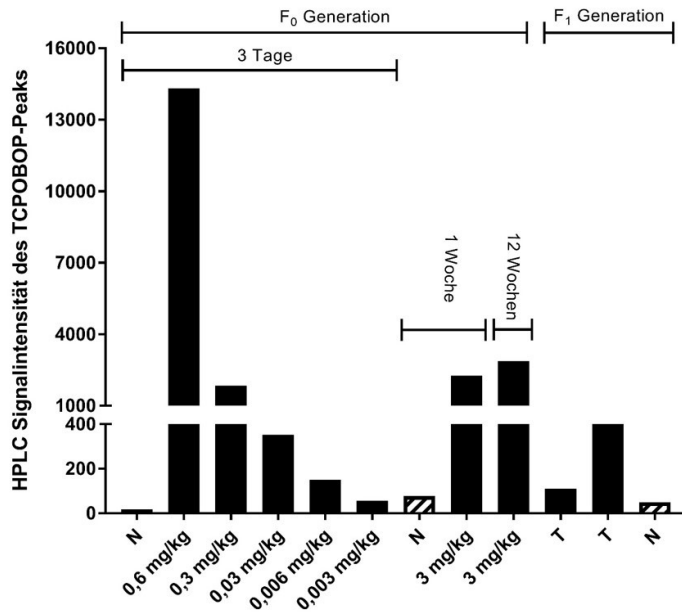


Abb. A 9: Nachweis von TCPOBOP in murinem Fettgewebe mittels HPLC-MS/MS (ohne Quantifizierung)

Testexperiment zur Detektion von TCPOBOP in murinem Fettgewebe von (1.) neun Wochen alten männlichen Mäusen, die drei Tage zuvor mit TCPOBOP (0,6 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,006 mg/kg oder 0,003 mg/kg i.p. in Maiskeimöl) behandelt wurden (2.) männlichen Mäusen, die im Alter von 6-8 Wochen mit TCPOBOP (3 mg/kg i.p. in Maiskeimöl) behandelt wurden und deren Gewebe nach einer bzw. 12 Wochen entnommen wurde und (3.) 12-15 Wochen alten männlichen F₁ Mäusen, deren Mütter präkonzeptionell mit TCPOBOP (3 mg/kg i.p. in Maiskeimöl) behandelt wurden; Dargestellt ist die Intensität des TCPOBOP-Peaks der HPLC (willkürliche Einheit), N = Negativ- bzw. Lösungsmittelkontrolle, T = F₁ Tier von einer mit TCPOBOP vorbehandelten Mutter.

Abbildung erstellt basierend auf Daten aus HPLC-MS-Analysen durchgeführt von M. M. (Institut für Molekulare Biologie [IMB] Mainz)

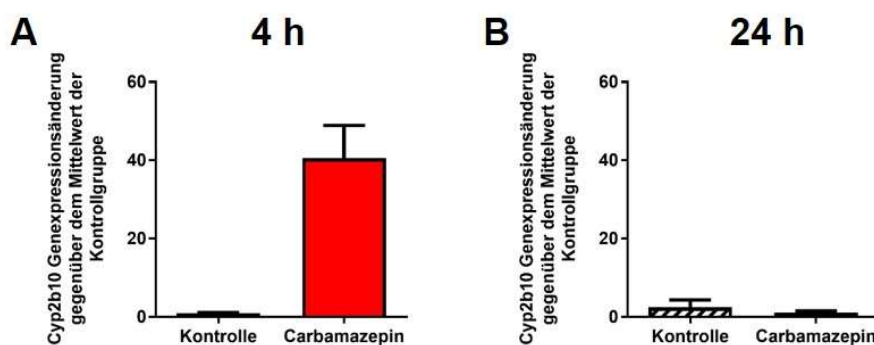


Abb. A 10: Hepatische Cyp2b10-Expression 4h und 24h nach Applikation von Carbamazepin

Analyse der hepatischen Cyp2b10-Expression von (A) adulten weiblichen F₀ Mäusen, die zweimal im Abstand von 12h mit Carbamazepin (20mg/kg; i.p.) in DMSO/Maiskeimöl (10/90) behandelt und 4 Stunden nach der zweiten Applikation untersucht wurden (B) adulten weiblichen F₀ Mäusen, die dreimal im Abstand von 24h mit Carbamazepin (20mg/kg; i.p.) in DMSO/Maiskeimöl (10/90) behandelt und 24 Stunden nach der dritten Applikation untersucht wurden; Die hepatische Cyp2b10 mRNA Expression wurde mittels TaqMan und $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode ermittelt. Dargestellt sind die Genexpressionsänderungen gegenüber dem Mittelwert der Lösungsmittelkontrolle (Mittelwert mit Standardfehler; n=3-4); auf Grund der kleinen Gruppengrößen erfolgten keine statistischen Analysen.

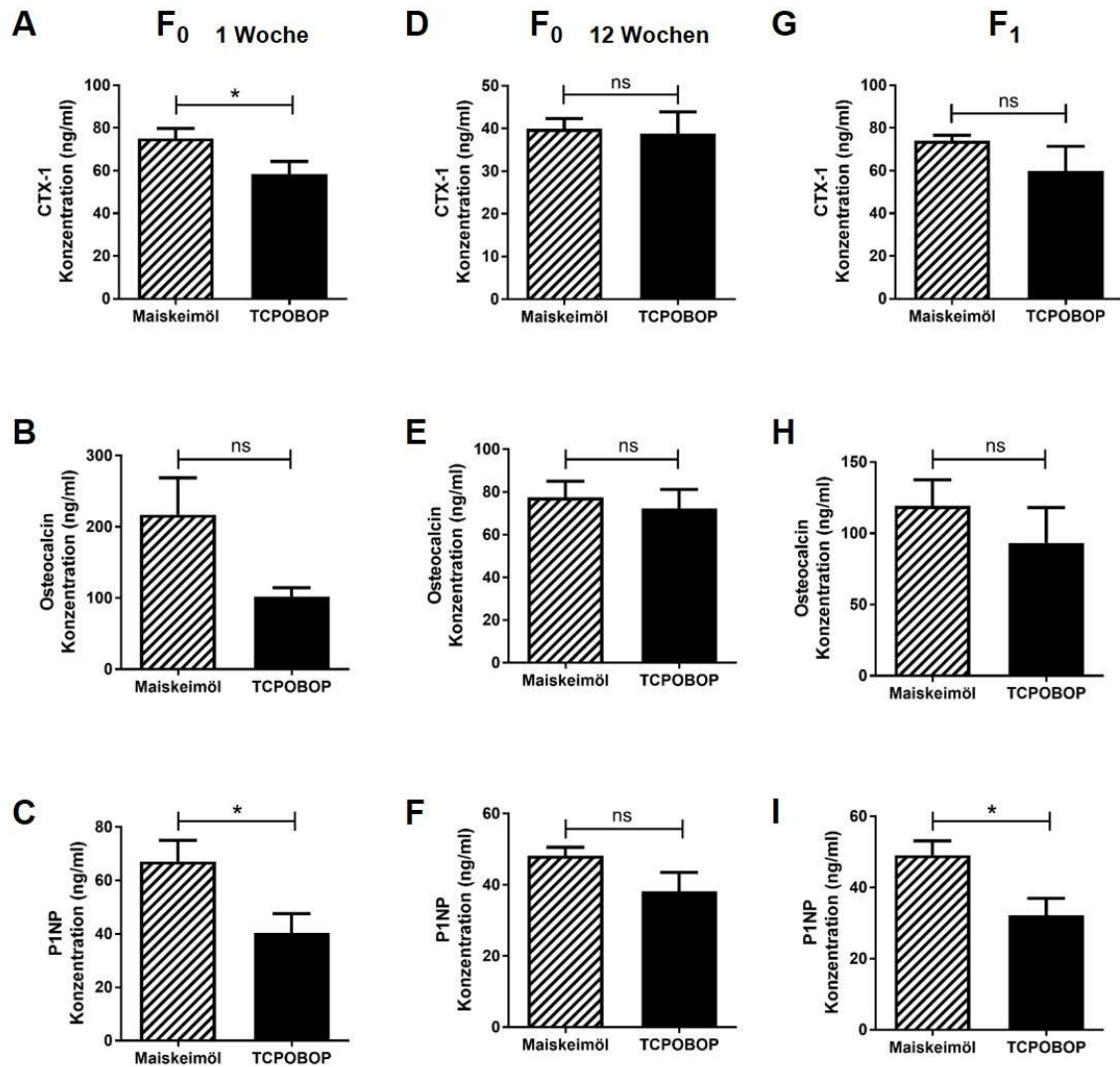


Abb. A 11: ELISA-basierte Konzentrationsbestimmung knochenspezifischer Marker im Blutserum TCPOBOP behandelte Tiere und ihrer Nachkommen nach 16-stündigem Fasten

Knochenspezifische Marker im Blutserum adulter Böcke ($n=6-7$) eine Woche (A-C) und 12 Wochen (D-F) nach der Injektion von TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl im Alter von 8 Wochen sowie von zwölf Wochen alten männlichen Nachkommen (G-I; $n=5-8$) präkonzeptionell einmalig mit TCPOBOP (3 mg/kg) oder Maiskeimöl behandelte adulter weiblicher Mäuse. Mit Hilfe kommerzieller ELISA-Lösungen (vgl. 2.2.7; Tab. 4) wurden das Knochen-Abbauprodukt CTX-1 (C-terminales Telopeptid von Kollagen I; A, D, G) sowie die Marker für knochenbildende Osteoblasten-Aktivität P1NP (N-terminales Propeptid von Kollagen I; C, F, I) und Osteocalcin (B, E, H) untersucht. Dargestellt sind die jeweiligen Serumkonzentrationen in ng/ml (Mittelwert mit Standardfehler). Statistisch signifikante Unterschiede wurden nach einem Shapiro-Wilk Tests auf Normalverteilung mittels t-test ermittelt und mit Sternchen gekennzeichnet (*, $p<0,05$). Abbildung erstellt basierend auf Daten aus ELISA-Analysen durchgeführt von U. G.-A. (Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin Mainz).

Tab. A 4: Erkennungssequenzen nukleärer Rezeptoren im erweiterten Promotorbereich (6 kb) der murinen Cytochrom P450 Isoformen 2b10, 3a11 und 2c29

Die Identifikation und Lokalisation der pallindromischen Bindestellen nukleärer Rezeptoren erfolgte mit Hilfe der Online-Applikation NHR Scan (Sandelin und Wasserman 2005) anhand der entsprechenden Genombereiche, welche vorab mit Hilfe des Genome Browsers der UCSC (University of California Santa Cruz) aus dem murinen Genom (GRCm38/mm10) extrahiert wurden.

Cyp2b10		Cyp3a11		Cyp2c29	
IR1	- 0,5 kb	IR1	- 1,2 kb	DR4	- 1,5 kb
IR1	- 1,3 kb	ER6	- 2,1 kb	DR4	- 1,8 kb
DR0	- 1,7 kb	ER1	- 2,5 kb	DR4	- 1,9 kb
DR4	- 2,1 kb	IR1	- 4,4 kb	DR1	- 4,4 kb
ER8	- 2,7 kb	DR0	- 5,1 kb	DR4	- 4,6 kb
DR4	- 3,6 kb	DR1	- 5,4 kb	ER1	- 4,7 kb
ER1	- 3,7 kb	DR4	- 5,8 kb	DR1	- 5,8 kb
DR0	- 4,0 kb	DR3	- 5,9 kb		
IR1	- 4,8 kb				
DR2	- 5,8 kb				

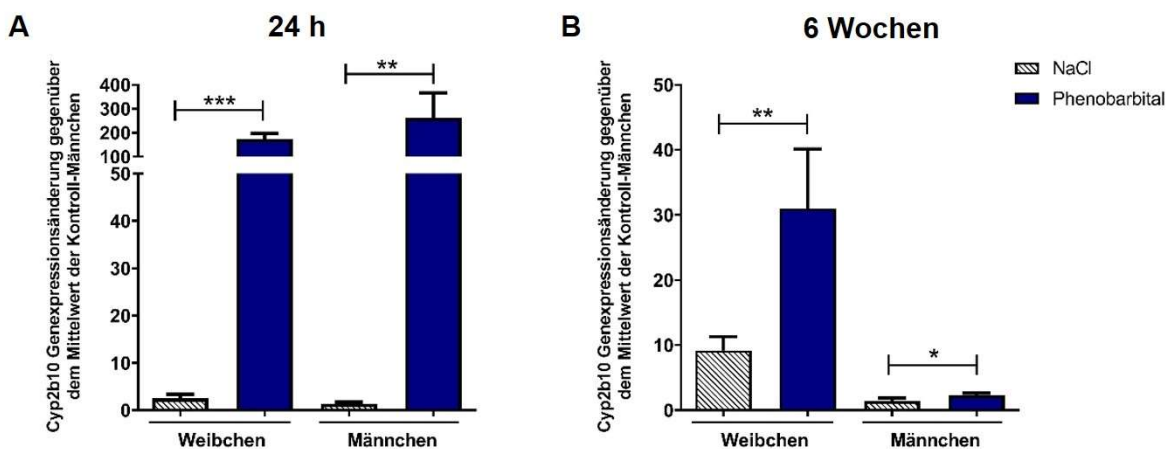


Abb. A 12: Hepatische Cyp2b10-Expression 24h und 6 Wochen nach neonataler Applikation von Phenobarbital

Analyse der hepatischen Cyp2b10-Expression von C57BL/6 Mäusen, welche im Alter von fünf Tagen mit Phenobarbital (100mg/kg; s.c.) oder NaCl-Lösung (0,9 % Isotonische Kochsalzlösung, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, DE) injiziert wurden, 24 Stunden (A; n=9-15) bzw. 6 Wochen (B; n=5-8) nach der Applikation; die hepatische Cyp2b10 mRNA Expression wurde mittels TaqMan und $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode ermittelt; dargestellt sind die Genexpressionsänderungen gegenüber dem Mittelwert der männlichen Tiere der Lösungsmittelkontrolle (Mittelwert mit Standardfehler); Statistisch signifikante Unterschiede wurden abhängig vom Ergebnis eines Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung paarweise mittels t-test bzw. Mann-Whitney-Test ermittelt und mit Sternchen gekennzeichnet (*, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$). Abbildung erstellt basierend auf Daten erhoben in Kooperation mit L. R.

B Danksagung

C Kongressbeiträge / Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Tagungsbeiträgen veröffentlicht:

Dietrich K., Mathaes M., Wojnowski, L. 2014. Transient CAR and PXR activation results in multigenerational gene expression changes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **387** (Suppl 1) S.7

(Vortrag bei der 80. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Hannover)

Dietrich K., Baumgart J., Eshkind L., Mathäs M., Wojnowski L. 2016. Mechanisms and multi-generational effects of xenosensor activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **389** (Suppl 1) S.13

(Vortrag bei der 82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Berlin)

Eine Publikation zu der vorliegenden Arbeit befindet sich in Vorbereitung.

D Lebenslauf

