

Serumfreie Collagen Monolayer- und Sandwich-Kulturen primärer Hepatozyten als ein wertvolles Modell zur Detektion von Toxizität und Arzneimittelwechselwirkungen *in vitro*

Dissertation
zur Erlangung des Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

im Promotionsfach Pharmakologie und Toxikologie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Gregor Tuschl

geb. in Aalen

Mainz, den 18. April 2011

Erster Berichtstatter:

Zweiter Berichtstatter:

Datum der mündlichen Prüfung: 6. Juli 2011

DANKSAGUNG

Vielen Dank an Alle die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG	3
INHALTSVERZEICHNIS.....	4
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	6
1. KURZZUSAMMENFASSUNG	7
2. ABSTRACT.....	8
3. FRAGESTELLUNG UND ZIELE.....	9
4. KUMULATIVE DISSERTATION	10
4.1 Liste der Veröffentlichungen und eigener Beitrag zu den Publikationen.....	10
4.1.1 Originalarbeiten	10
4.1.2 Reviews	12
4.1.3 Buchkapitel	13
5. ZUSAMMENFASSUNG DER VERÖFFENTLICHTEN ARBEITEN	14
5.1 Zellkulturen primärer Hepatozyten und deren Anwendung in der Arzneimittelentwicklung – Stand der Forschung und aktuelle Entwicklungen (Anhänge 9, 10 & 11).....	14
5.2 Untersuchung der speziesspezifischen Wirkung von Substanzen in Zellkulturen primärer Hepatozyten von Ratte und Mensch hinsichtlich Toxizität und Auswirkungen auf den Fremdstoffmetabolismus.....	17
5.2.1 Diclofenac und Troglitazon (Anhänge 5 & 9)	17
5.2.2 EMD 392949 (Anhänge 1, 4, 6 & 7)	17
5.2.3 CYP-Induktion (Anhang 4)	19
5.3 Charakterisierung von Langzeitzellkulturen primärer Rattenhepatozyten (Anhänge 2, 8, 9, 10 & 11 sowie unveröffentlichte Ergebnisse)	20
6. WEITERE UNVERÖFFENTLICHTE ERGEBNISSE.....	25
6.1 Charakterisierung von Langzeitkulturen primärer Humanhepatozyten.....	25
6.2 Charakterisierung der humanen Hepatomazelllinie HepaRG	31
6.3 Vergleich verschiedener Leber-Kulturmodelle	35
6.3.1 Genexpression in Ratten-Leber- <i>in vitro</i> -Modellen.....	35
6.3.2 Genexpression in humanen Leber- <i>in vitro</i> -Modellen	37
7. DISKUSSION (ANHÄNGE 1 – 11 SOWIE KAPITEL 5.3 & 6).....	40
8. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	46
9. LITERATURVERZEICHNIS	48
ANHANG: SONDERDRUCKE DER EIGENEN PUBLIKATIONEN	54
Anhang 1: S.O. Mueller, Y. Fery, G. Tuschl, D. Schrenk, Species-specific activation of nuclear receptors correlates with the response of liver drug metabolizing enzymes to EMD 392949 <i>in vitro</i> , Toxicol Lett. 193(1) (2010) 120-123.....	55

Anhang 2: G. Tuschl, J. Hrach, Y. Walter, P.G. Hewitt, S.O. Mueller, Serum-free collagen sandwich cultures of adult rat hepatocytes maintain hepatotypic properties long term: A valuable model for in vitro toxicity and drug-drug interaction studies, Chem Biol Interact 181(1) (2009) 124-137.	56
Anhang 3: P. Godoy, J.G. Hengstler, I. Ilkavets, C. Meyer, A. Bachmann, A. Muller, G. Tuschl, S.O. Mueller, S. Dooley, Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor beta-induced apoptosis, Hepatology 49(6) (2009) 2031-2043.	57
Anhang 4: L. Richert, G. Tuschl, C. Abadie, N. Blanchard, D. Pekthong, G. Manton, J.C. Weber, S.O. Mueller, Use of mRNA expression to detect the induction of drug metabolising enzymes in rat and human hepatocytes, Toxicol Appl Pharmacol 235(1) (2009) 86-96.	58
Anhang 5: B. Lauer, G. Tuschl, M. Kling, S.O. Mueller, Species-specific toxicity of diclofenac and troglitazone in primary human and rat hepatocytes, Chem Biol Interact 179(1) (2009) 17-24.	59
Anhang 6: L. Richert, G. Tuschl, C. Viollon-Abadie, N. Blanchard, A. Bonet, B. Heyd, N. Halkic, E. Wimmer, H. Dolgos, S.O. Mueller, Species differences in the response of liver drug-metabolizing enzymes to (S)-4-O-tolylsulfanyl-2-(4-trifluoromethyl-phenoxy)-butyric acid (EMD 392949) in vivo and in vitro, Drug Metab Dispos 36(4) (2008) 702-714.	60
Anhang 7: S.O. Mueller, G. Tuschl, M. Kling, Alternatives in pharmaceutical toxicology: global and focussed approaches—two case studies, ALTEX 24(2) (2007) 117-124.	61
Anhang 8: G. Tuschl, S.O. Mueller, Effects of cell culture conditions on primary rat hepatocytes - Cell morphology and differential gene expression, Toxicology 218(2-3) (2006) 205-215.	62
Anhang 9: G. Tuschl, B. Lauer, S.O. Mueller, Primary hepatocytes as a model to analyze species-specific toxicity and drug metabolism, Expert Opin Drug Metab Toxicol 4(7) (2008) 855-870.	63
Anhang 10: N.J. Hewitt, M.J. Lechon, J.B. Houston, D. Hallifax, H.S. Brown, P. Maurel, J.G. Kenna, L. Gustavsson, C. Lohmann, C. Skonberg, A. Guillouzo, G. Tuschl, A.P. Li, E. LeCluyse, G.M. Grootuis, J.G. Hengstler, Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies, Drug Metab Rev 39(1) (2007) 159-234.	64
Anhang 11: G. Tuschl, J. Hrach, P. Hewitt, S.O. Mueller, Application of Short and Long-Term Hepatocyte Cultures to Predict Toxicities, in: S.C. Sahu (Ed.), Hepatotoxicity: From genomics to in vitro and in vivo models, John Wiley & Sons, Chichester, UK, (2007) 141-174.	65
WEITERE VERÖFFENTLICHUNGEN	66
LEBENS LAUF	67
EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	68

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Definition
3-MC	3-Methyl-cholantren
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	bioartificial liver – künstliche Leber
BNF	beta-Naphtoflavon
Carboxy-DCFDA	5-(und-6)-Carboxy-2',7'-dichlorfluorescein-diacetat
Comp.	Komponente
CTB	Cell Titer Blue
CYP	Cytochrom P450 Enzym
d	Tage
DEX	Dexamethason
DILI	drug induced liver injury – medikamenteninduzierte Lebertoxizität
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMD	Merck Entwicklungssubstanz
Fao	Rattenhepatomazelllinie
FCS	fetal calf serum – fötales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration (amerikanische Arzneimittelzulassungsbehörde)
GSH	Glutathion
h	Stunde(n)
H4IIE	Rattenhepatomazelllinie
HCI	High Content Imaging
HepaRG	humane Hepatomazelllinie
HepG2	humane Hepatomazelllinie
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
ML	Monolayerkultur
ML-FCS	serumfreie Monolayerkultur
mRNA	messenger RNA - Boten-Ribonukleinsäure
OMP	Omeprazol
PB	Phenobarbital
PCA	Prinzipielle Komponentenanalyse
PCN	Pregnancarbonitril
PPAR	Peroxisomen-Proliferator aktivierter Rezeptor
RIF	Rifampicin
RLU	relative luminescence units – relative Lumineszenzeinheiten
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SELDI-TOF-MS	surface enhanced laser desorption ionization – time of flight – mass spectrometry
SW	Sandwichkultur
SW-FCS	serumfreie Sandwichkultur

1. KURZZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden Zellkulturen primärer Hepatozyten von Ratte und Mensch hinsichtlich ihrer Eignung untersucht. Speziesunterschiede der toxischen Wirkung und des Metabolismus von Substanzen darzustellen und inwieweit die *in vitro*-Ergebnisse *in vivo* vergleichbar bzw. übertragbar sind. Des Weiteren wurde ein Zellkulturmodell entwickelt, das eine Kultivierung von primären Hepatozyten aus Ratte, Mensch und Maus über einen Zeitraum von mindestens einer bis zwei Wochen erlaubt.

Die Zellkulturen primärer Hepatozyten von Ratte und Mensch zeigten deutliche Unterschiede in der substanzinduzierten Veränderung der Genexpression nach Behandlung mit den, vor allem für den Menschen, lebertoxischen Substanzen Diclofenac und Troglitazon. Diese Unterschiede traten hauptsächlich in der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme sowie deren transkriptionsregulierenden Kernrezeptoren in den humanen Hepatozyten auf. Ebenso war eine verstärkte Stressantwort zu beobachten.

Deutliche Speziesunterschiede konnten ebenso in der Wirkung der Arzneimittelentwicklungssubstanz EMD 392949 auf die Aktivität bzw. Genexpression von Cytochrom P450 Enzymen sowie deren Regulatoren nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte hier eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse aus den Zellkulturen primärer Ratten- bzw. Humanhepatozyten mit jenen aus *in vivo*-Experimenten mit Ratten bzw. Affen (*Macaca fascicularis*) beobachtet werden, was die Aussagekraft der Primärkulturen verdeutlichte.

Die große Übereinstimmung zwischen Enzymaktivität und Genexpression in der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme konnte durch die Behandlung mit einer Reihe speziesspezifischer Induktoren in Zellkulturen primärer Ratten- bzw. Humanhepatozyten bestätigt werden; vor allem nach dem von der amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde (FDA, Food and Drug Administration) vorgeschlagenen Bewertungsschema zur Untersuchung der CYP-Induktion.

Die Lebensdauer sowie der Differenzierungsgrad von primären Hepatozyten in Kultur sind stark abhängig von den Zellkulturbedingungen. Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass spezifische Eigenschaften von Rattenleberzellen durch Kultivierung in einem Sandwich aus zwei hydratisierten Collagengelschichten und unter serumfreien Bedingungen für einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen aufrechterhalten werden können. Dieses Kulturmodell konnte auf Primärhepatozyten von Mensch und Maus übertragen werden und erweitert die möglichen Anwendungen hin zu einer Behandlung über einen längeren Zeitraum und der Untersuchung von subchronischen Effekten.

2. ABSTRACT

This work was dedicated to the investigation of primary rat and human hepatocyte cell cultures regarding their ability to display species differences in the toxicity and metabolism of xenobiotics and whether these results allow for an *in vitro* – *in vivo*-correlation. In addition, a cell culture model was established that allows for the cultivation of primary hepatocytes from rat, human and mouse for a minimum of one to two weeks with preserved liver-like properties.

After treatment of primary rat and human hepatocytes with the human hepatotoxicants diclofenac and troglitazone, cultures showed distinct species-specific differences in their gene expression response. Induction of drug metabolizing enzymes and their transcriptional regulators occurred predominantly in human hepatocytes, along with an increased stress reaction.

Distinct species differences regarding the activity and gene expression of cytochrome P450 enzymes were also observed after treatment of primary rat and human hepatocyte cell cultures with the drug development candidate EMD 392949, once again accompanied by a corresponding reaction of the nuclear receptors regulating their transcription. Moreover, in this study there was a strong correlation between results from primary rat and human hepatocyte cultures in comparison to *in vivo* experiments in rats and monkeys (*Macaca fascicularis*) which greatly strengthens the value of the *in vitro* experiments.

The good correlation of enzyme activity and mRNA levels regarding the induction of drug metabolizing enzymes was confirmed using various species specific inducers for the treatment of primary rat and human hepatocyte cultures, especially when evaluating CYP induction according to the FDA's (Food and Drug Administration) recommendation.

The differentiation status and durability of primary hepatocytes in culture strongly depends on the applied cell culture conditions. In this work we showed that culturing primary rat hepatocytes between two layers of gelled collagen I under serum-free conditions retained liver-like properties for a minimum of two weeks. Furthermore, this culture model was successfully transferred to primary human and mouse hepatocytes and greatly expands the use of primary hepatocyte cell cultures towards the investigation of subchronic toxicities after repeated long-term treatment and additional analyses.

3. FRAGESTELLUNG UND ZIELE

Die Entwicklung eines neuen Arzneimittels ist ein sehr zeit- und kostenintensiver Prozess. Man geht heute von Entwicklungskosten von mehr als einer Milliarde EUR/USD und einer Entwicklungsdauer von 12 bis 15 Jahren aus, um ein Produkt erfolgreich auf den Markt zu bringen. Ein Grund dafür liegt in der Tatsache, dass viele Substanzen relativ spät im Entwicklungsprozess scheitern. So treten Probleme oft erst bei der ersten klinischen Anwendung am Menschen oder gar nach der Markteinführung auf. Ursache dafür sind Substanzwirkungen, die speziesspezifisch nur im Menschen und teilweise nur sehr selten, d. h. innerhalb größerer Patientengruppen, auftreten. Dabei kommt der Leber als zentralem Stoffwechselorgan eine besondere Rolle zu. Dies erklärt auch, warum medikamenteninduzierte Lebertoxizität eine der am häufigsten auftretenden schädlichen Wirkungen ist, die zum Stopp der Entwicklung eines Arzneimittels oder der Marktrücknahme führen, und in den Spezies der toxikologischen Untersuchungen in der präklinischen Forschung nicht entdeckt werden kann. Um dies zu umgehen werden unterschiedliche *in vitro*-Lebermodelle angewandt. Dies ermöglicht zum einen den Zugang zu humanem Versuchsmaterial aus nicht-transplantierbaren Lebern bzw. dem gesunden Gewebe von Leberresektaten und zum anderen das Potential die Zahl der notwendigen Tierversuche für toxikologische Prüfungen gemäß dem 3R-Prinzip (refine, reduce, replace / verbessern, verringern, ersetzen) zu reduzieren.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der Substanzwirkung auf Zellkulturen primärer Hepatozyten aus Ratte und Mensch - im Hinblick auf deren speziesspezifischen Veränderungen der Genexpression. Dabei lag der Fokus vor allem auf Genen des Fremdstoffmetabolismus sowie genereller Zellschädigung bzw. Toxizität. Da Arzneimittelwechselwirkungen im Menschen häufig zu Leberschädigung führen, sollte im Besonderen die Induktion der Cytochrom P450 Enzyme (CYP) sowie deren Regulatoren untersucht werden. Ziel dieser Arbeiten war die Etablierung von Screening-Tests die möglichst früh Auskunft über speziesspezifisch auftretende Lebertoxizität bzw. potentielle Arzneimittelwechselwirkungen liefern.

Ein weiteres Ziel war die Etablierung und Charakterisierung eines Langzeitzellkulturmodells für primäre Hepatozyten. Dabei sollte der Erhalt leberspezifischer Funktionen über einen längeren Zeitraum gewährleistet sein, um die Untersuchungen hinsichtlich Lebertoxizität und Arzneimittelwechselwirkungen auf eine Langzeitbehandlung ausdehnen zu können. Außerdem sollte die Möglichkeit untersucht werden durch die Langzeitkulturen weitere leberspezifische Funktionen zu analysieren und das Modell auf zusätzliche Spezies zu übertragen.

4. KUMULATIVE DISSERTATION

Die vorliegende Dissertation wurde in kumulativer Form angefertigt und beruht auf den folgenden Veröffentlichungen. Die Arbeiten der Veröffentlichungen sind in Kapitel 5 zusammenfassend dargestellt. Die Sonderdrucke der Veröffentlichungen befinden sich im Anhang. In Kapitel 5.3 sind die veröffentlichten Daten durch weitere, bisher unveröffentlichte Resultate ergänzt. Zusätzlich sind in Kapitel 6 weitere, bisher unveröffentlichte, Ergebnisse beschrieben. Die gemeinsame Diskussion aller Ergebnisse erfolgt in Kapitel 7.

4.1 Liste der Veröffentlichungen und eigener Beitrag zu den Publikationen

4.1.1 Originalarbeiten

S.O. Mueller, Y. Fery, **G. Tuschl**, D. Schrenk, Species-specific activation of nuclear receptors correlates with the response of liver drug metabolizing enzymes to EMD 392949 in vitro, *Toxicol Lett.* 193(1) (2010) 120-123. (Anhang 1)

Der Beitrag von Gregor Tuschl zu dieser Veröffentlichung bestand in der Diskussion der Ergebnisse sowie der Überarbeitung des Manuskripts.

G. Tuschl, J. Hrach, Y. Walter, P.G. Hewitt, S.O. Mueller, Serum-free collagen sandwich cultures of adult rat hepatocytes maintain hepatotypic properties long term: A valuable model for in vitro toxicity and drug-drug interaction studies, *Chem Biol Interact* 181(1) (2009) 124-137. (Anhang 2)

Die Konzeption dieser Veröffentlichung wurde von Gregor Tuschl, Jens Hrach, Philip G. Hewitt und Stefan O. Müller gemeinsam erarbeitet. Gregor Tuschl plante die experimentelle Durchführung und führte alle Experimente sowie die Datenanalyse selbständig aus; mit Ausnahme der SELDI-TOF-MS Analyse. Ebenso wurden alle Abbildungen und Tabellen sowie das Manuskript von Gregor Tuschl erstellt.

P. Godoy, J.G. Hengstler, I. Ilkavets, C. Meyer, A. Bachmann, A. Müller, **G. Tuschl**, S.O. Mueller, S. Dooley, Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor beta-induced apoptosis, *Hepatology* 49(6) (2009) 2031-2043. (Anhang 3)

Der Beitrag von Gregor Tuschl zu dieser Publikation umfasste die Bereitstellung der selbst entwickelten Methode zur Langzeitkultivierung primärer Hepatozyten sowie das

Training von P. Godoy und A. Müller in dieser Technik. Des Weiteren arbeitete Gregor Tuschl bei der Diskussion der Ergebnisse sowie bei der Erstellung des Manuskripts mit.

L. Richert, **G. Tuschl**, C. Abadie, N. Blanchard, D. Pekthong, G. Manton, J.C. Weber, S.O. Mueller, Use of mRNA expression to detect the induction of drug metabolising enzymes in rat and human hepatocytes, *Toxicol Appl Pharmacol* 235(1) (2009) 86-96. (Anhang 4)

Der Beitrag von Gregor Tuschl zu dieser Veröffentlichung umfasste die experimentelle Durchführung sowie die Datenanalyse und Erstellung der Abbildungen sämtlicher Genexpressionsstudien der zur Verfügung gestellten Zellkulturproben. Das Manuskript wurde von Gregor Tuschl überarbeitet. Gregor Tuschl und L. Richert sind Co-Erstautoren dieser Veröffentlichung.

B. Lauer, **G. Tuschl**, M. Kling, S.O. Mueller, Species-specific toxicity of diclofenac and troglitazone in primary human and rat hepatocytes, *Chem Biol Interact* 179(1) (2009) 17-24. (Anhang 5)

Die Konzeption dieser Veröffentlichung wurde von Birthe Lauer, Gregor Tuschl und Stefan O. Müller gemeinsam erarbeitet. Gregor Tuschl unterstützte Birthe Lauer bei der Planung, experimentellen Durchführung, Datenanalyse sowie der Erstellung des Manuskripts.

L. Richert, **G. Tuschl**, C. Viollon-Abadie, N. Blanchard, A. Bonet, B. Heyd, N. Halkic, E. Wimmer, H. Dolgos, S.O. Mueller, Species differences in the response of liver drug-metabolizing enzymes to (S)-4-O-tolylsulfanyl-2-(4-trifluormethyl-phenoxy)-butyric acid (EMD 392949) in vivo and in vitro, *Drug Metab Dispos* 36(4) (2008) 702-714. (Anhang 6)

Der Beitrag von Gregor Tuschl zu dieser Veröffentlichung umfasste die experimentelle Durchführung sowie die Datenanalyse sämtlicher Genexpressionsstudien der zur Verfügung gestellten Zellkultur- bzw. Gewebeproben. Das Manuskript mit allen Abbildungen und Tabellen wurde von Gregor Tuschl erstellt. Gregor Tuschl und L. Richert sind Co-Erstautoren dieser Veröffentlichung.

S.O. Mueller, **G. Tuschl**, M. Kling, Alternatives in pharmaceutical toxicology: global and focussed approaches--two case studies, *ALTEX* 24(2) (2007) 117-124. (Anhang 7)

Der Beitrag von Gregor Tuschl zu dieser Veröffentlichung umfasste die Anfertigung der Textvorlage für die Einleitung sowie das zweite der beiden dargestellten Fallbeispiele.

Die Abbildungen hierfür sowie die zugrunde liegende Proben- und Datenanalyse wurden von Gregor Tuschl erstellt.

G. Tuschl, S.O. Mueller, Effects of cell culture conditions on primary rat hepatocytes - Cell morphology and differential gene expression, *Toxicology* 218(2-3) (2006) 205-215. (Anhang 8)

Die Konzeption dieser Veröffentlichung wurde von Gregor Tuschl und Stefan O. Müller gemeinsam erarbeitet. Gregor Tuschl plante die experimentelle Durchführung und führte alle Experimente sowie die Datenanalyse selbständig aus. Ebenso wurden alle Abbildungen und Tabellen sowie das Manuskript von Gregor Tuschl erstellt.

4.1.2 Reviews

G. Tuschl, B. Lauer, S.O. Mueller, Primary hepatocytes as a model to analyze species-specific toxicity and drug metabolism, *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4(7) (2008) 855-870. (Anhang 9)

Die Konzeption dieser Veröffentlichung wurde von Gregor Tuschl und Stefan O. Müller gemeinsam erarbeitet. Die Planung und experimentelle Durchführung wurde von Gregor Tuschl und Birthe Lauer gemeinsam geleistet. Die Abbildungen und Tabellen sowie die zugrunde liegende Datenanalyse wurden je zur Hälfte von Gregor Tuschl und Birthe Lauer ausgearbeitet. Das Manuskript wurde von Gregor Tuschl erstellt.

N.J. Hewitt, M.J. Lechon, J.B. Houston, D. Hallifax, H.S. Brown, P. Maurel, J.G. Kenna, L. Gustavsson, C. Lohmann, C. Skonberg, A. Guillouzo, **G. Tuschl**, A.P. Li, E. LeCluyse, G.M. Groothuis, J.G. Hengstler, Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies, *Drug Metab Rev* 39(1) (2007) 159-234. (Anhang 10)

Der Beitrag von Gregor Tuschl zu dieser Veröffentlichung umfasste Text und Abbildungen der Kapitel „*The Basic Hepatocyte Culture - does Matrix Overlay Make a Difference?*“ und „*Genomics and Proteomics*“.

4.1.3 Buchkapitel

G. Tuschl, J. Hrach, P. Hewitt, S.O. Mueller, Application of Short and Long-Term Hepatocyte Cultures to Predict Toxicities, in: S.C. Sahu (Ed.), Hepatotoxicity: From genomics to in vitro and in vivo models, John Wiley & Sons, Chichester, UK, (2007) 141-174. (Anhang 11)

Die Konzeption dieser Veröffentlichung wurde von allen Autoren gemeinsam erarbeitet. Die Planung und experimentelle Durchführung wurde von Gregor Tuschl und Jens Hrach gemeinsam geleistet. Die Abbildungen und Tabellen sowie die zugrunde liegenden Datenanalysen wurden zu 75% von Gregor Tuschl und zu 25% von Jens Hrach erarbeitet. Das Manuskript wurde von Gregor Tuschl erstellt.

5. ZUSAMMENFASSUNG DER VERÖFFENTLICHTEN ARBEITEN

5.1 Zellkulturen primärer Hepatozyten und deren Anwendung in der Arzneimittelentwicklung – Stand der Forschung und aktuelle Entwicklungen (Anhänge 9, 10 & 11)

In vitro-Modelle werden heute in vielen Bereichen der Arzneimittelentwicklung eingesetzt und leisten einen wichtigen Beitrag dazu, möglichst wirksame und sichere Medikamente auf den Markt zu bringen (s. Anhang 9). So konnte in den letzten 20 Jahren der Anteil der Entwicklungssubstanzen, die auf Grund von nicht vorhersagbarer Pharmakokinetik, Stoffwechsel oder Bioverfügbarkeit im Menschen gescheitert waren, durch die Entwicklung prädiktiver *in vitro*- und *in vivo*-Modelle von 40% auf 10% gesenkt werden. Heute sind die Hauptursachen für den Abbruch von Entwicklungsprogrammen eine geringe Wirksamkeit oder das Auftreten von unerwarteten Toxizitäten, darunter vor allem die Medikamenten-induzierte Lebertoxizität (drug induced liver injury, DILI), im Menschen [Ballet, 1997; Fung, 2001; Kola und Landis, 2004]. Speziesunterschiede im Vergleich zu präklinischen Studien und die mangelnde physiologische Relevanz von *in vitro*-Modellen machen eine Vorhersage dieser Aspekte für den Menschen äußerst schwierig, und so werden nach wie vor etwa 90% potentieller Medikamente während der klinischen Entwicklung gestoppt.

Es existieren zahlreiche Modelle, um die Funktion und die Wirkung von Substanzen auf die Leber *in vitro* zu untersuchen, die jeweils spezifische Vor- bzw. Nachteile aufweisen (s. Anhang 11) [Ulrich *et al.*, 1995; Guillouzo, 1998; Groneberg *et al.*, 2002; Brandon *et al.*, 2003; Farkas und Tannenbaum, 2005]. In isolierten perfundierten Lebern oder Leberschnitten sind alle Zellstrukturen wie im intakten Organ erhalten. Der physiologische Zustand besteht allerdings nur für kurze Zeit, daher sind diese Modelle für maximal ca. 24 h einsetzbar. Auf der anderen Seite wird versucht aus Leberzellsuspensionen sog. „künstliche Lebern“ (bioartificial liver systems, BAL) herzustellen. Dadurch ist es teilweise gelungen, die Organfunktionen *in vitro* nachzubilden. Diese Systeme sind allerdings sehr aufwändig herzustellen und zu unterhalten. In der toxikologischen Substanzprüfung spielen die beschriebenen Modelle nur eine untergeordnete Rolle, können auf Grund ihrer Komplexität jedoch wertvolle Informationen in der Aufklärung toxischer Mechanismen liefern [Kresse *et al.*, 2005; Mertsching *et al.*, 2005].

Ebenso können an der Vermittlung von Hepatotoxizität verschiedene Leberzelltypen wie z. B. Hepatozyten und Kupfferzellen gemeinsam beteiligt sein [Kresse *et al.*, 2005]. Obwohl es sehr schwierig ist, ideale Kulturbedingungen für alle unterschiedlichen Zelltypen zu wählen, um sämtliche physiologischen Funktionen der Zellen aufrecht erhalten zu können,

wird auf diese Weise versucht das Zusammenwirken in der Leber nachzubilden [Kmiec, 2001; Uyama *et al.*, 2002].

Die am häufigsten verwendeten *in vitro*-Modelle der Leber stellen aber wohl die Zellkulturen primärer Hepatozyten dar. Die Leber besteht zu 60 – 70% aus Hepatozyten und diese vermitteln die wichtigsten Stoffwechselfunktionen. Hepatozyten sind polar differenzierte Zellen, deren Orientierung in der biologischen Matrix eine wichtige Rolle für ihre Funktion spielt. Abbildung 5.1.1 zeigt die schematische Darstellung eines Hepatozyten in der Leber mit den umgebenden Gefäßsystemen. Während der Isolation geht diese Orientierung verloren, durch die Wahl geeigneter Kulturbedingungen ist es jedoch möglich zahlreiche physiologische Eigenschaften *in vitro* wiederzuerlangen. Eine detaillierte Untersuchung verschiedener Hepatozytenzellkulturen von Ratte und Mensch ist im weiteren Verlauf der Kapitel 5 und 6 anhand der dargestellten Arbeiten und Ergebnisse beschrieben.

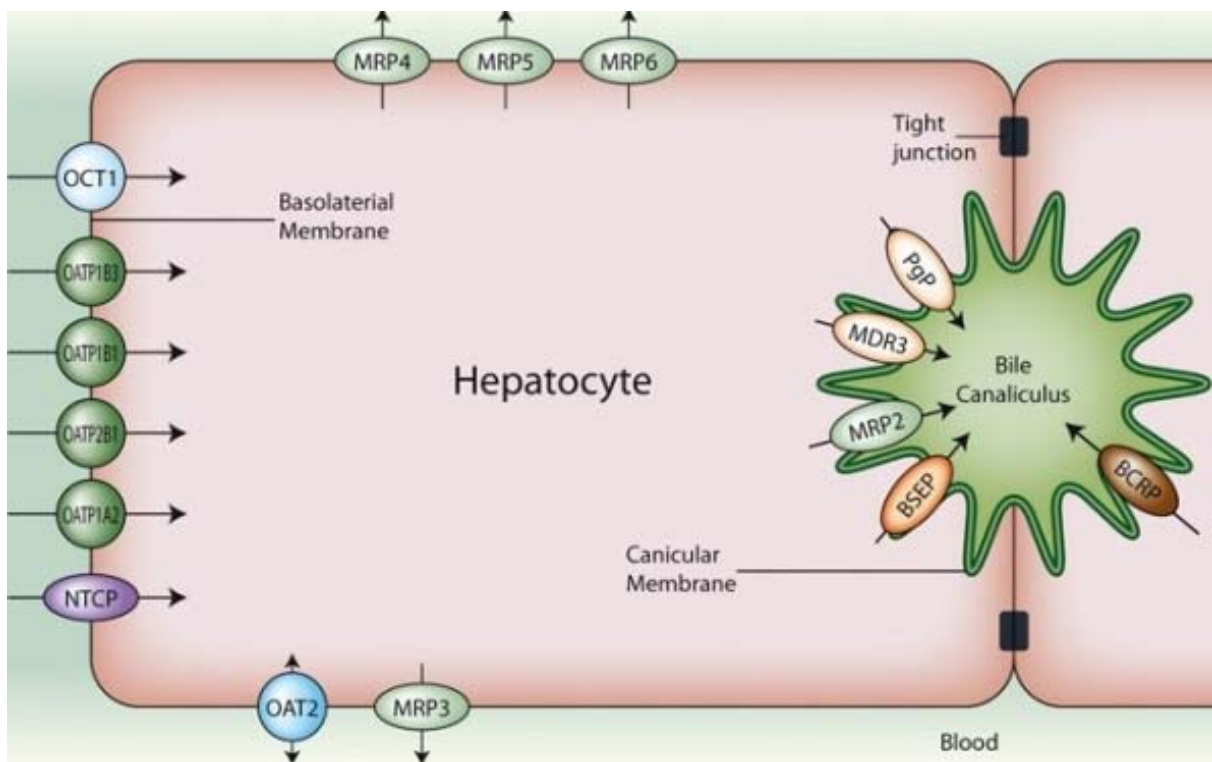


Abbildung 5.1.1: Schematische Darstellung zweier benachbarter Hepatozyten sowie Lokalisierung der Aufnahme- bzw. Effluxtransporter in der Hepatozytenmembran. (Quelle: <http://www.solvobiotech.com/Solvo%20Solutions/liver.html>)

Zellkulturen primärer Hepatozyten sind natürlich nicht in der Lage die *in vivo*-Situation perfekt nachzubilden, sie bieten jedoch die Möglichkeit eine Vielzahl physiologischer Funktionen *in vitro* in einer definierten Umgebung zu untersuchen. Durch die Möglichkeit, sehr viele Proben aus einer Leber zu gewinnen, und die Verwendung menschlicher Zellen, leisten Zellkulturen primärer Hepatozyten auch einen wertvollen Beitrag zur Verbesserung,

Verringerung und Vermeidung von Tierversuchen nach dem Prinzip der 3 „R“ (refine, reduce, replace / verbessern, verringern, ersetzen) [Russell und Burch, 1959]. Eine generelle Limitierung ist natürlich die Verfügbarkeit humaner Lebern bzw. Leberzellen, die zumeist aus nicht-transplantierbaren Organen bzw. aus Leberresektaten stammen [Richert *et al.*, 2004]. Um dies zu umgehen werden daher häufig humane Leberhepatoma-Zelllinien eingesetzt. Zelllinien, wie z. B. HepG2, haben jedoch meist eine stark verringerte Stoffwechselaktivität, vor allem in deren Ausstattung mit den Cytochrom P450 Enzymen der Phase I des Fremdstoffmetabolismus [Westerink und Schoonen, 2007b; Westerink und Schoonen, 2007a]. Zelllinien mit höherem Differenzierungsgrad könnten daher besser geeignet sein, um Substanzwirkungen *in vitro* zu untersuchen [Hartung und Gribaldo, 2004; Aninat *et al.*, 2006]. Dies verdeutlicht, dass bestimmte *in vitro*-Modelle auch nur dafür geeignet sind bestimmte Endpunkte zu untersuchen.

Zellkulturen primärer Hepatozyten gelten heute als *in vitro*-Modell der Wahl für eine Reihe von Untersuchungen im Laufe der Arzneimittelentwicklung (s. Anhang 10). In frühen Phasen finden diese hauptsächlich Anwendung zur Untersuchung des Stoffwechsels sowie der Pharmako- bzw. Toxikokinetik einer Substanz, deren Einfluss auf die Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme, hauptsächlich CYPs, sowie Transportaktivität und zur Bestimmung der Zytotoxizität von Substanzen. Während der klinischen Entwicklung können vor allem humane Hepatozyten zur Aufklärung der Mechanismen potentiell auftretender Nebenwirkungen eingesetzt werden. So konnte gezeigt werden, dass eine hohe Übereinstimmung des Stoffwechsels einer Substanz *in vitro* und *in vivo* besteht [Ponsoda *et al.*, 2001]. In der präklinischen Phase der Entwicklung ist die Bestimmung der Arzneimittelwechselwirkung eines der wichtigsten Einsatzgebiete primärer Hepatozytenkulturen [Gomez-Lechon *et al.*, 2004] und diese sind heute durch die regulatorischen Behörden anerkannt [Huang und Stifano, 2006]. Zusätzlich werden große Anstrengungen unternommen mit Hilfe von Hepatozytenkulturen arzneimittelinduzierte Lebertoxizität im Menschen, einem der häufigsten Gründe warum Medikamente zu einem späten Zeitpunkt ihrer Entwicklung gestoppt oder vom Markt zurückgenommen werden müssen, vorherzusagen. Nach Analyse der Genexpression, Proteinexpression oder funktioneller Parameter *in vitro*, und dem Vergleich mit *in vivo*-Daten, werden aus diesen Ergebnissen Profile erzeugt, die in der Lage sind die Befunde *in vivo* vorherzusagen [Farkas und Tannenbaum, 2005; Lee und Senior, 2005; O'Brien *et al.*, 2006; Guengerich und MacDonald, 2007]. Das diesbezügliche Potential unterschiedlicher Langzeit-*in vitro*-Organmodelle und verschiedener Analysemethoden wird derzeit unter anderem in dem von der EU geförderten Projekt Predict-IV (<http://www.predict-iv.toxi.uni-wuerzburg.de/>) untersucht.

5.2 Untersuchung der speziesspezifischen Wirkung von Substanzen in Zellkulturen primärer Hepatozyten von Ratte und Mensch hinsichtlich Toxizität und Auswirkungen auf den Fremdstoffmetabolismus

5.2.1 Diclofenac und Troglitazon (Anhänge 5 & 9)

Troglitazon ist ein Peroxisomen-Proliferator aktivierter Rezeptor (PPAR) γ -Agonist und wurde zur Behandlung von Diabetes Typ II entwickelt [Tugwood *et al.*, 1996]. Nach nur 1½ Jahren und etwa 100 Fällen akuten Leberversagens, davon mehr als 60 mit Todesfolge, musste das Medikament vom Markt genommen werden [Neuschwander-Tetri *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 2000]. Jedoch auch Medikamente, die sehr breite Anwendung in der Bevölkerung finden, können, vor allem bei unsachgemäßer Dosierung, schwere Leberschäden verursachen, wie zum Beispiel das Analgetikum Paracetamol oder das Antiphlogistikum Diclofenac [Helfgott *et al.*, 1990; Boelsterli, 2003; Guengerich und MacDonald, 2007]. Das schädigende Potential dieser Medikamente im Menschen konnte durch präklinische Tierversuche nicht vorhergesagt werden.

Durch die in Anhang 5 und 9 beschriebenen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass durch die Behandlung von Zellkulturen primärer Ratten- und humaner Hepatozyten mit unterschiedlichen Dosen von Diclofenac bzw. Troglitazon für 24 h, deutliche Speziesunterschiede in der Expression bestimmter Gene auftraten; ins besondere für Troglitazon. Die Behandlung mit Diclofenac verursachte ähnliche Effekte in beiden Kulturen, die Ausprägung war jedoch in humanen Hepatozyten stärker. Beide Substanzen führten zu einer deutlichen - und dosisabhängig verstärkten - Expression von Markergenen für oxidativen Stress in humanen Hepatozyten. Die deutlichsten Speziesunterschiede zeigten sich in der Induktion der Expression von CYP1A2, CYP2C und CYP3A4 vor allem in den Zellkulturen humaner Hepatozyten. Beide Substanzen werden vor allem durch CYP2C und CYP3A4 umgesetzt, welche die toxischen Metaboliten bilden, die durch oxidativen Stress die Zellen schädigen. Die Ergebnisse stehen also in direktem Zusammenhang zum vermuteten Mechanismus der Toxizität und unterstreichen den Beitrag, den Zellkulturen primärer Hepatozyten zur Vorhersage potentiell auftretender schädigender Wirkungen im Menschen sowie deren zugrunde liegenden molekularen Mechanismen leisten können.

5.2.2 EMD 392949 (Anhänge 1, 4, 6 & 7)

Das vorherige Beispiel zeigte deutlich, dass die Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme zur verstärkten Bildung toxisch wirkender Metaboliten führen kann. Unerwartete

Effekte können des Weiteren auftreten, wenn durch die verstärkte Expression von CYPs die Stoffwechselrate und damit die Wirksamkeit des verabreichten Medikaments bzw. weiterer Medikamente verändert werden. Der Arzneimittelentwicklungskandidat EMD 392949 wurde zur Behandlung von Diabetes Typ II entwickelt und ist ein gemischter PPAR α/γ -Agonist. Durch die PPAR γ -Wirkung wird die Insulinsensitivität verbessert und die Adipozytendifferenzierung unterstützt, um Glucose aus dem Blut zu entfernen. Durch die PPAR α -Wirkung wird der Fettabbau gefördert um der meist ursächlichen bzw. begleitenden Fettleibigkeit entgegenzuwirken. In regulatorischen *in vivo*-Studien mit EMD 392949 zeigte sich ein nicht-proportionaler Anstieg der Exposition mit der Dosierung, vor allem in Affen (*Macaca fascicularis*), nicht jedoch in Ratten; was Hinweise auf eine erhöhte Stoffwechselrate des Medikaments in Affen gab. Um dies näher zu untersuchen, wurden in den Lebern behandelter Ratten bzw. Affen sowie in Zellkulturen primärer Ratten- bzw. humaner Hepatozyten, die Aktivität verschiedener CYPs sowie die Genexpression einiger fremdstoffmetabolisierender Enzyme und PPAR-Markergenen untersucht (s. Anhang 6).

In den Lebern der untersuchten Ratten sowie in den Rattenhepatozytenkulturen zeigte sich eine deutlich verringerte Expression von CYP1A2 und CYP2C sowie die Induktion von CYP2B1 und der PPAR α -Markergene CYP4A3, ACOX1 und CPT1a. Die Ergebnisse ließen sich für CYP1A und CYP4A auf Aktivitätsebene bestätigen, im Falle von CYP2B war hier der Effekt deutlich verringert. Die Untersuchung der CYP-Aktivitäten in Affenlebern und humanen Hepatozytenkulturen zeigten neben einer moderaten Induktion von CYP2B bzw. CYP4A und einer schwachen Repression von CYP1A vor allem eine starke Induktion von CYP3A. Auf Genexpressionsebene war ebenso eine starke Induktion von CYP3A und zusätzlich von CYP2C sowohl *in vivo* in Affen als auch *in vitro* in humanen Hepatozyten zu beobachten. Die CYP1A-Expression war ebenso wie in Ratten deutlich verringert, die Auswirkungen auf CYP2B waren nur schwach ausgeprägt. Vor allem nach verlängerter Expositionsdauer war auch die Induktion der PPAR α -Markergene CYP4A11, ACOX1 und CPT1a zu sehen. Diese Ergebnisse bestätigten die speziesspezifische Induktion von CYP2C und CYP3A und daraus folgend eine veränderte Stoffwechselrate von EMD 392949 in Affen bzw. Menschen, nicht jedoch in der Ratte. Untersuchungen der Transaktivierung in der humanen Hepatomazelllinie HepG2 bzw. der Rattenhepatomazelllinie H4IIE bestätigten weiterhin, dass der transkriptionsregulierende Kernrezeptor PXR (Pregnan-X-Rezeptor) von CYP2C und CYP3A nur in den menschlichen Zellen aktiviert wurde (s. Anhang 1). Insgesamt war eine sehr hohe Übereinstimmung der Ergebnisse aus *in vivo*- mit *in vitro*-Experimenten, vor allem in der Ratte, zu beobachten (s. Anhänge 4, 6 und 7). Weiterhin zeigten sich einerseits die Resultate aus den Affen als prädiktiv für die Situation im Menschen; andererseits konnten diese Ergebnisse auch direkt mit humanen Hepatozytenkulturen gewonnen werden.

Zellkulturen primärer Hepatozyten sind also ein aussagekräftiges Modell um mögliche Arzneimittelwechselwirkungen speziesspezifisch vorherzusagen zu können.

5.2.3 CYP-Induktion (Anhang 4)

Der erste Hinweis auf den veränderten Stoffwechsel einer Substanz ist meist eine Induktion der CYP-Enzyme. Dies kann durch Autoinduktion durch die verabreichte Substanz selbst oder durch eine Co-Medikation erfolgen. Dadurch können sowohl Arzneimittelwechselwirkungen auftreten als auch toxisch wirkende Metaboliten verstärkt gebildet werden. Da die Auswirkungen auf eine tatsächliche Co-Medikation im Menschen erst in einer größeren Patientengruppe zu beobachten sind, treten diese meist in klinischen Studien der Phase III oder erst nach der Marktzulassung auf. Daher ist es besonders wichtig, mögliche Arzneimittelwechselwirkungen möglichst früh während der Entwicklung eines neuen Medikaments, und vor allem speziesspezifisch, zu untersuchen und die Wirkung im Menschen vorherzusagen. Zu diesem Zweck wurden in der in Anhang 4 aufgeführten Arbeit die Aktivitäten verschiedener CYPs sowie die Expression dieser CYPs und weiterer Gene des Fremdstoffmetabolismus nach Behandlung mit prototypischen CYP-Induktoren in Zellkulturen primärer Ratten- und Humanhepatozyten untersucht. Wie erwartet wurde CYP1A in beiden Spezies am stärksten durch 3-Methyl-cholantren (3-MC) und beta-Naphtoflavon (BNF) und in humanen Hepatozyten etwas geringer auch durch Omeprazol (OMP) induziert. CYP2B-Induktion war am stärksten ausgeprägt nach Phenobarbital- (PB) Behandlung in beiden Spezies, in Rattenhepatozyten konnten erhöhte Werte auch nach Fenofibratbehandlung und in Humanhepatozyten nach Rifampicinbehandlung beobachtet werden. Die deutlichsten Speziesunterschiede traten bei CYP3A auf. Die stärkste Induktion in der Ratte wurde durch Dexamethason (DEX) und Pregnanarbonitril (PCN) hervorgerufen, welche in humanen Hepatozyten nur geringe Wirkung zeigten. Hier wurde die größte Induktion durch Rifampicin (RIF) und PB hervorgerufen, letzteres zeigte auch in Rattenhepatozyten etwas erhöhte Werte. Da im Vergleich zu Enzymaktivitäten Veränderungen auf Genexpressionsebene meist deutlich stärker ausgeprägt sind, ist ein Vergleich der absoluten Werte relativ zu den Kontrollproben zwischen den beiden Methoden nur wenig aufschlussreich. Bei Definition einer speziesspezifischen Positivkontrolle für jedes CYP und Darstellung der Ergebnisse einer Testsubstanz als prozentualer Anteil der Induktion der Positivkontrolle zeigten sich jedoch sehr große Übereinstimmungen. Diese Art der Präsentation entspricht der Empfehlung der amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA [Huang und Stifano, 2006]. Die mRNA-Analyse stellt also, auch aufgrund des höheren Durchsatzes und der größeren Sensitivität, eine geeignete Screening-Methode zur Bestimmung der CYP-Induktion dar. Die Untersuchung der

Expression weiterer Gene des Fremdstoffmetabolismus zeigte, dass CYPs die am stärksten deregulierten Gene waren. Weiterhin können dadurch aber auch Hinweise auf potenzielle Arzneimittelwechselwirkungen durch Konjugationsenzyme (Phase II) bzw. Transporter (Phase III) erhalten werden oder den Wirkungsmechanismus einer Substanz erklären helfen.

5.3 Charakterisierung von Langzeitzellkulturen primärer Rattenhepatozyten (Anhänge 2, 8, 9, 10 & 11 sowie unveröffentlichte Ergebnisse)

Sämtliche der unter 5.2 dargestellten Ergebnisse wurden aus sog. Monolayerzellkulturen primärer Hepatozyten gewonnen. Dabei werden die Zellen auf einem getrockneten Collagenfilm kultiviert, um die Anheftung, aber vor allem die Differenzierung der Hepatozyten in Zellkultur zu unterstützen und zu fördern. Die bisher gezeigten Ergebnisse zeigten deutlich, welche wertvollen Ergebnisse dieses *in vitro*-Modell liefern kann. Dennoch ist der differenzierte Zustand nicht stabil und eine Verwendung der Zellkulturen nur bis maximal drei Tage nach Aussaat möglich. Um die Möglichkeit einer Langzeitkultivierung primärer Rattenhepatozyten zu beurteilen, wurde der Einfluss verschiedener Medienzusammensetzungen sowie Extrazellulärmatrixumgebungen auf die Hepatozyten in Kultur untersucht. Dabei zeigte sich, dass ausschließlich die Kultivierung unter serumfreien (-FCS) Bedingungen und zwischen zwei hydratisierten Collagengelschichten (Sandwich, SW) den differenzierten Zustand über einen Zeitraum von mindestens zehn Tagen stabil erhalten konnte (s. Anhänge 2, 9 und 11). Hier zeigten sich klar definierte Zell- bzw. Kerngrenzen, ein klares Zytoplasma, stabile Zellaggregate und die Ausbildung von Gallenkanälchen. Dieser morphologische Zustand blieb für bis zu drei Wochen in Kultur erhalten (Abbildung 5.3.1).

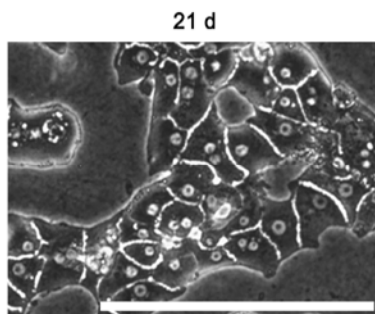


Abbildung 5.3.1: Phasenkontrastaufnahme von Rattenhepatozyten in serumfreier Sandwichkultur nach 21-tägiger Inkubation. Der weiße Messbalken am unteren Rand des Bildes entspricht 200 µm.

Neben der Kultivierung unter serumfreien Bedingungen erwies sich vor allem die dreidimensionale Umgebung der Zellen mit Extrazellulärmatrix als besonders wichtig für die morphologische Differenzierung. So war es zum Beispiel möglich durch Überschichtung

einer Monolayerkultur mit einem Collagengel die Lebensdauer der Hepatozyten in Kultur auf mindestens eine Woche auszudehnen, wenn die Überschichtung spätestens vier Stunden nach Aussaat erfolgte (s. Anhang 10 und Abbildung 5.3.2).

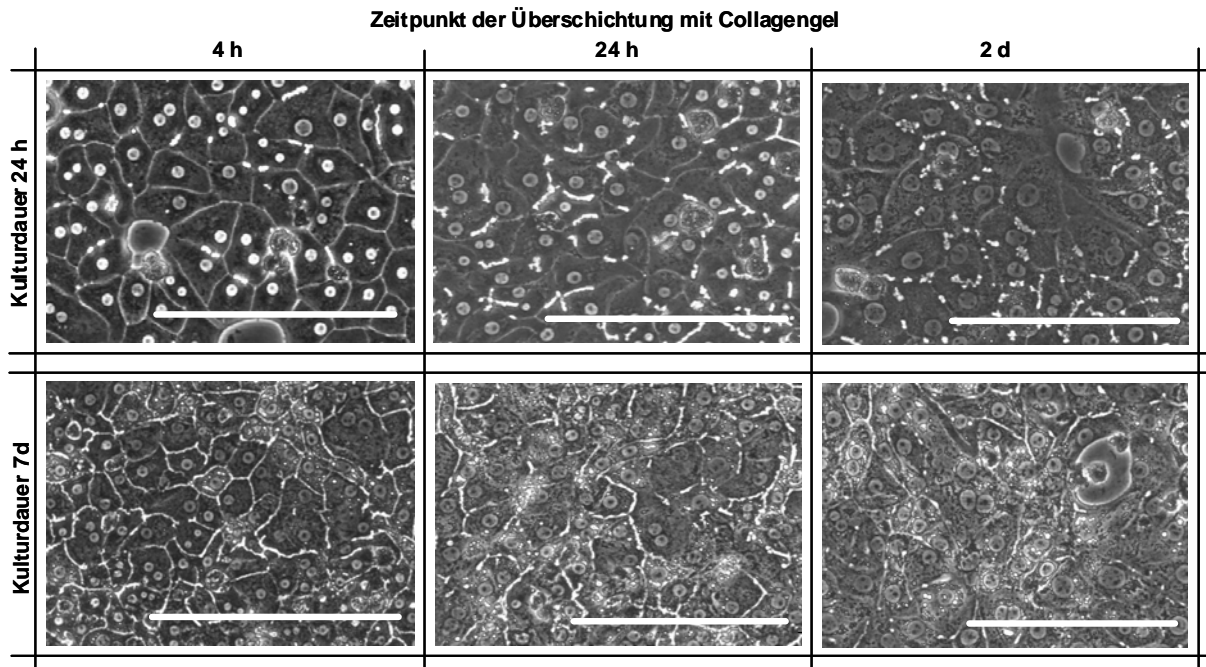


Abbildung 5.3.2:

Phasenkontrastaufnahmen primärer Rattenhepatozyten. Die Zellen wurden auf einem getrockneten Collagenfilm (Monolayer) ausplattiert und nach unterschiedlicher Kulturdauer unter serumfreien Bedingungen mit einem Collagengel überschichtet. Der weiße Messbalken am unteren Rand der Bilder entspricht 200 µm.

Neben morphologischen Gesichtspunkten wurden einige funktionelle Parameter in den unterschiedlichen Hepatozytenkulturen untersucht. Wie in Anhang 2 dargestellt, konnte dabei unter anderem die Funktion der, vor allem im serumfreien Sandwich gebildeten, Gallenkanälchen nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte sich im Laufe der Kultivierung über zehn Tage, im Vergleich zu den anderen Kulturbedingungen, in Sandwich ohne FCS eine geringere LDH-Freisetzung durch eine geschädigte Zytoplasmamembran, geringere Apoptoseinduktion sowie ein erhöhter Glutathion-(GSH) Gehalt, der nach zwischenzeitlichem Anstieg nahe den physiologischen Werten *in vivo* war.

Wie aus den in Kapitel 5.2 beschriebenen Ergebnissen hervorgeht, ist der Nachweis der CYP-Induktion ein wichtiges und wertvolles Anwendungsgebiet von Zellkulturen primärer Hepatozyten. In den Langzeitkulturen (s. Anhang 2) schwankte die Aktivität von CYP1A nur wenig mit der Zeit und war in den Monolayer- bzw. Sandwichkulturen mit und ohne FCS sehr ähnlich. CYP2B-Aktivität war ausschließlich in Sandwich ohne FCS messbar. Die Aktivität von CYP2C war in den beiden Sandwichkulturen und die Aktivität von CYP3A in den beiden serumfreien Kulturen um etwa zwei- bis dreifach höher im Vergleich zu den übrigen Kulturen.

Die Induzierbarkeit der vier untersuchten CYPs war auf Aktivitätsebene über den gesamten Beobachtungszeitraum von zehn Tagen nur in den Sandwichkulturen gegeben. Für CYP1A und CYP2B waren dabei die Effekte stärker unter serumfreien Bedingungen, für CYP2C und CYP3A nahezu identisch. Obwohl eine erhöhte CYP-Aktivität nach Behandlung mit den prototypischen Induktoren BNF, PB und DEX in der serumfreien Monolayerkultur nach erhöhter Kulturdauer nicht mehr nachzuweisen war, zeigte sich eine verstärkte mRNA-Expression sowohl in Monolayer ohne FCS als auch in Sandwich ohne FCS auch noch nach zehntägiger Kulturdauer (Abbildung 5.3.3). Dies unterstreicht erneut die höhere Sensitivität der Genexpressionanalyse zur Messung der CYP-Induktion.

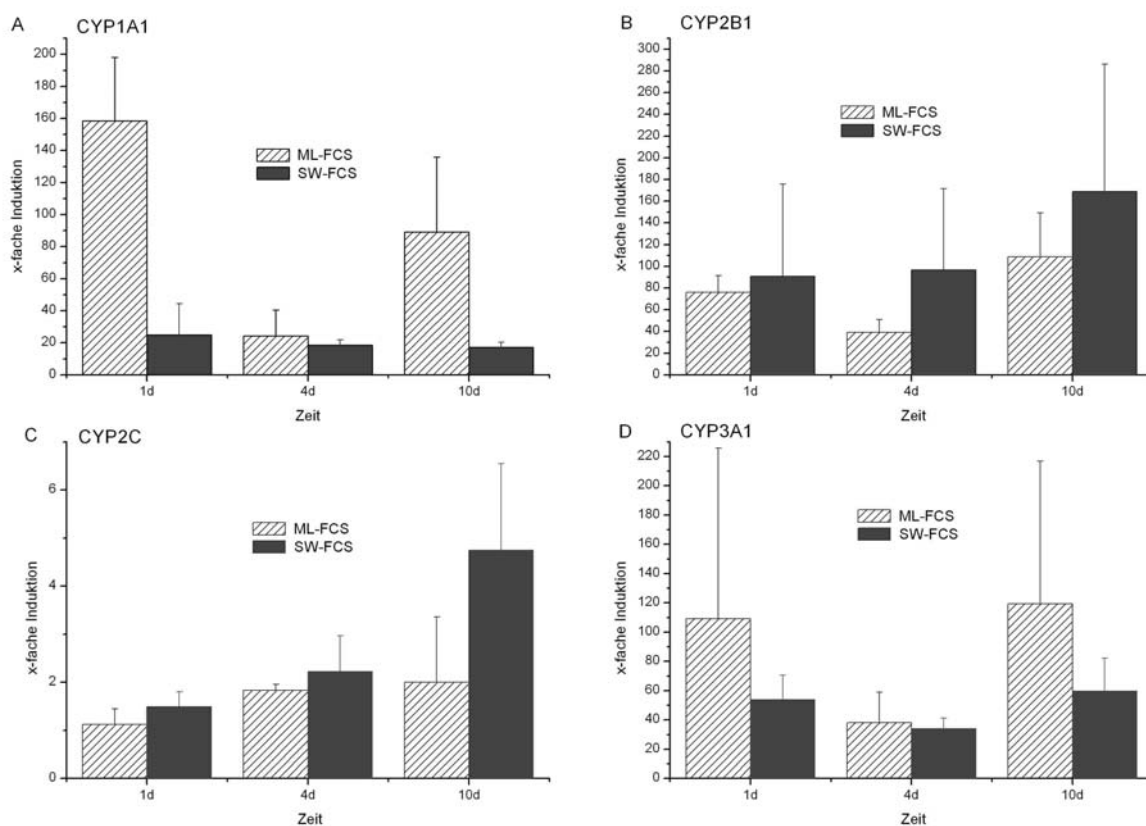


Abbildung 5.3.3:

Cytochrom P450 mRNA-Expression in serumfreien (-FCS) Monolayer- (ML) bzw. Sandwich- (SW) Zellkulturen primärer Rattenhepatozyten nach Behandlung mit Induktoren. Die Zellkulturen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten einmalig behandelt und nach 48-stündiger Inkubation durch RT-PCR analysiert. Es sind die Mittelwerte der Regulation relativ zu den Lösemittelkontrollen aus drei unabhängigen Experimenten (unterschiedliche Zellpräparationen) mit Standardabweichung dargestellt. A Induktion von CYP1A1 nach Behandlung mit 10 µM beta-Naphtoflavon (BNF). B Induktion von CYP2B1 nach Behandlung mit 500 µM Phenobarbital (PB). C Induktion von CYP2C nach Behandlung mit 500 µM Phenobarbital (PB). D Induktion von CYP3A1 nach Behandlung mit 50 µM Dexamethason (DEX).

Diese Ergebnisse konnten durch eine Western-Blot Analyse auf Proteinebene bestätigt werden (Abbildung 5.3.4).

Die Untersuchung der basalen Genexpression der Cytochrom P450 Enzyme wies ebenso deutliche Unterschiede zwischen den Kulturen auf (s. Anhänge 2 und 8). In beiden serumhaltigen Kulturen waren die vier untersuchten CYPs über die Zeit stark reprimiert in ihrer Expression. CYP1A2 war jedoch in allen Kulturen deutlich herunterreguliert. CYP2C war in Sandwich ohne FCS zu frühen Zeitpunkten (Tag 1 bis Tag 4), in der serumfreien Monolayerkultur ab Tag 4 geringer exprimiert. CYP2B1 und CYP3A1 zeigten einen zeitlichen Anstieg der Expression unter serumfreien Bedingungen.

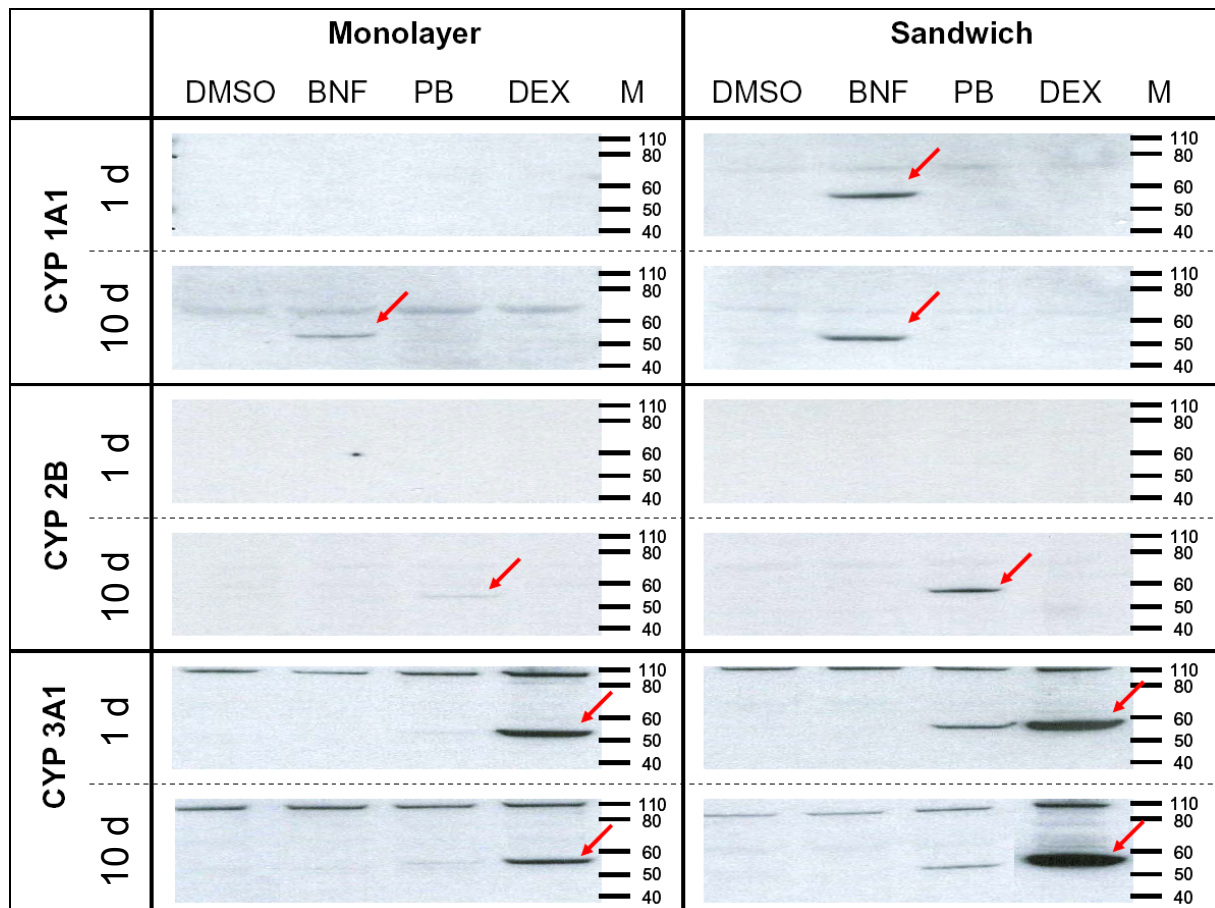


Abbildung 5.3.4:

Western-Blot Analyse der Cytochrom P450 Protein-Expression in serumfreien Monolayer- bzw. Sandwich- Zellkulturen primärer Rattenhepatozyten. Die Zellkulturen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten einmalig mit dem Lösemittel DMSO bzw. den Induktoren behandelt und nach 48-stündiger Inkubation analysiert. Induktion von CYP1A1 nach Behandlung mit 10 μ M beta-Naphtoflavon (BNF). Induktion von CYP2B nach Behandlung mit 500 μ M Phenobarbital (PB). Induktion von CYP3A1 nach Behandlung mit 50 μ M Dexamethason (DEX). Die roten Pfeile markieren jeweils die Banden der nachgewiesenen CYPs. (M = Molekulargewicht)

Die Untersuchung der Expression von 47 Genen mittels RT-PCR (s. Anhang 2), welche wichtige Hepatozytenfunktionen abbilden, ergab auf den ersten Blick ein ähnliches Muster in allen vier Kulturen, das sich deutlich von der physiologischen Expression in der Leber unterschied. Einige Gene, wie z.B. die beschriebenen CYPs, zeigten jedoch klare Unterschiede zwischen den Kulturen auf. Weiterhin war die Expression von Stressgenen in

allen Kulturen zu Beginn erhöht, in Sandwich ohne FCS kehrten diese jedoch mit fortschreitender Inkubationsdauer auf die Ausgangswerte zurück. Die Albuminexpression war in serumhaltigen Kulturen deutlich reduziert, in serumfreien Kulturen nahe den Werten in der Leber. Die Expression von CyclinD1 stieg ebenso mit der Zeit, vor allem in den serumhaltigen Kulturen und später auch in Monolayer ohne FCS, an, blieb in Sandwich ohne FCS jedoch nahezu unverändert. Ein Clustering der Genexpressionsunterschiede verdeutlichte die Sonderstellung der serumfreien Sandwichkultur; diese Proben waren die einzigen, die zusammen mit der Leber und frisch isolierten Hepatozyten in einem Cluster zusammenfielen, während die Proben aller anderen Kulturen davon getrennt lagen. Die Analyse der Expression von 550 Genen, die eine Rolle im Leberstoffwechsel und der Lebertoxizität spielen, zeigte noch deutlicher die Trennung von serumhaltigen und serumfreien Kulturen (s. Anhang 11). Zudem zeigte sich, dass, nach einer etwa dreitägigen Adaptionszeit die Expression in Sandwich ohne FCS zeitlich geringeren Veränderungen unterworfen ist als in serumfreier Monolayerkultur. Durch die SELDI-TOF-MS Proteinanalyse konnte die größere Ähnlichkeit der serumfreien Sandwichkultur zu frisch isolierten Hepatozyten im Vergleich zu Monolayer ohne FCS bestätigt werden (s. Anhang 2). Zusammenfassend kann die serumfreie Collagen-Sandwichkultur primärer Rattenhepatozyten als eine Möglichkeit zur Langzeitkultivierung angesehen werden, in der viele hepatozytenspezifische Funktionen erhalten bleiben.

6. WEITERE UNVERÖFFENTLICHTE ERGEBNISSE

6.1 Charakterisierung von Langzeitkulturen primärer Humanhepatozyten

Die unter 5.2 dargestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass Zellkulturen primärer humaner Hepatozyten wertvolle speziesspezifische Ergebnisse in Bezug auf die Toxifizierung von Substanzen und deren Auswirkungen auf den Fremdstoffmetabolismus liefern können. Daher wurde in einem weiteren Schritt überprüft, inwieweit die in 5.3 beschriebene Langzeitkultivierungsmethode für primäre Rattenhepatozyten auf humane Hepatozyten übertragbar ist. Dazu wurde die Collagen-Sandwich Methode unter serumfreien Bedingungen mit der Monolayerkultur verglichen. Um die Inkubationsdauer mit den Rattenhepatozytenkulturen zu vergleichen, muss beachtet werden, dass die humanen Hepatozyten zu den einzelnen Zeitpunkten, aufgrund von Isolation und Transport, ca. 16 Stunden länger in Kultur waren. Die Humanhepatozyten wurden von einem Kooperationspartner (KalyCell, Strasbourg, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Dort wurden die Zellsuspensionen aus den gesunden Gewebestücken von drei Individuen (Tabelle 6.1.1) gewonnen, die sich aufgrund von Krebsmetastasen einer teilweisen Leberresektion unterziehen mussten.

Tabelle 6.1.1: Übersicht der humanen Leberdonoren.

Donor	Isolation	Geschlecht	Alter	Erkrankung	Medikation	Zellvitalität	Anheftung
1	22.06.2006	♀	61	Leiomyosarcom	-	85.7%	76%
2	11.01.2007	♂	48	Colorectales Adenocarcinom	-	75.0%	63%
3	06.03.2007	♂	55	Colorectales Adenocarcinom	Lescol	81.4%	71%

Die Zellen wurden entweder auf einem Collagenfilm oder Collagengel ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Kulturen per Kurier in unser Labor transferiert, was damit $t = 0$ d entsprach (Rattenhepatozyten $t_0 =$ Aussaat). Alle weiteren Behandlungen und Analysen wurden unter identischen Bedingungen wie für die Rattenhepatozytenkulturen durchgeführt (s. Anhang 2). Bei morphologischer Betrachtung der Kulturen war in Monolayer, ebenso wie bei den Rattenhepatozytenkulturen, eine deutliche Veränderung nach dreitägiger Inkubation zu erkennen (Abbildung 6.1.1). Ab Tag 4 trat eine fortschreitende Auflösung der Zellgrenzen auf, die Zellkerne waren vergrößert und das Zytoplasma stark granuliert. In der Sandwichkultur zeigten sich nur geringe Veränderungen der Zellmorphologie, zumindest bis Tag 8. Die Hepatozyten behielten ihre Form, wiesen

klare Zellgrenzen auf, zeigten ein klares Zytoplasma, gallenkanälchenartige Strukturen in den Zellzwischenräumen und nahezu unveränderte Kerne. An Tag 10 ist eine Verschlechterung des Erscheinungsbilds zu erkennen, es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Qualität der Humanhepatozytenkulturen gewissen Schwankungen unterworfen ist und vor allem von der Qualität der gewonnenen Zellsuspension abhängt.

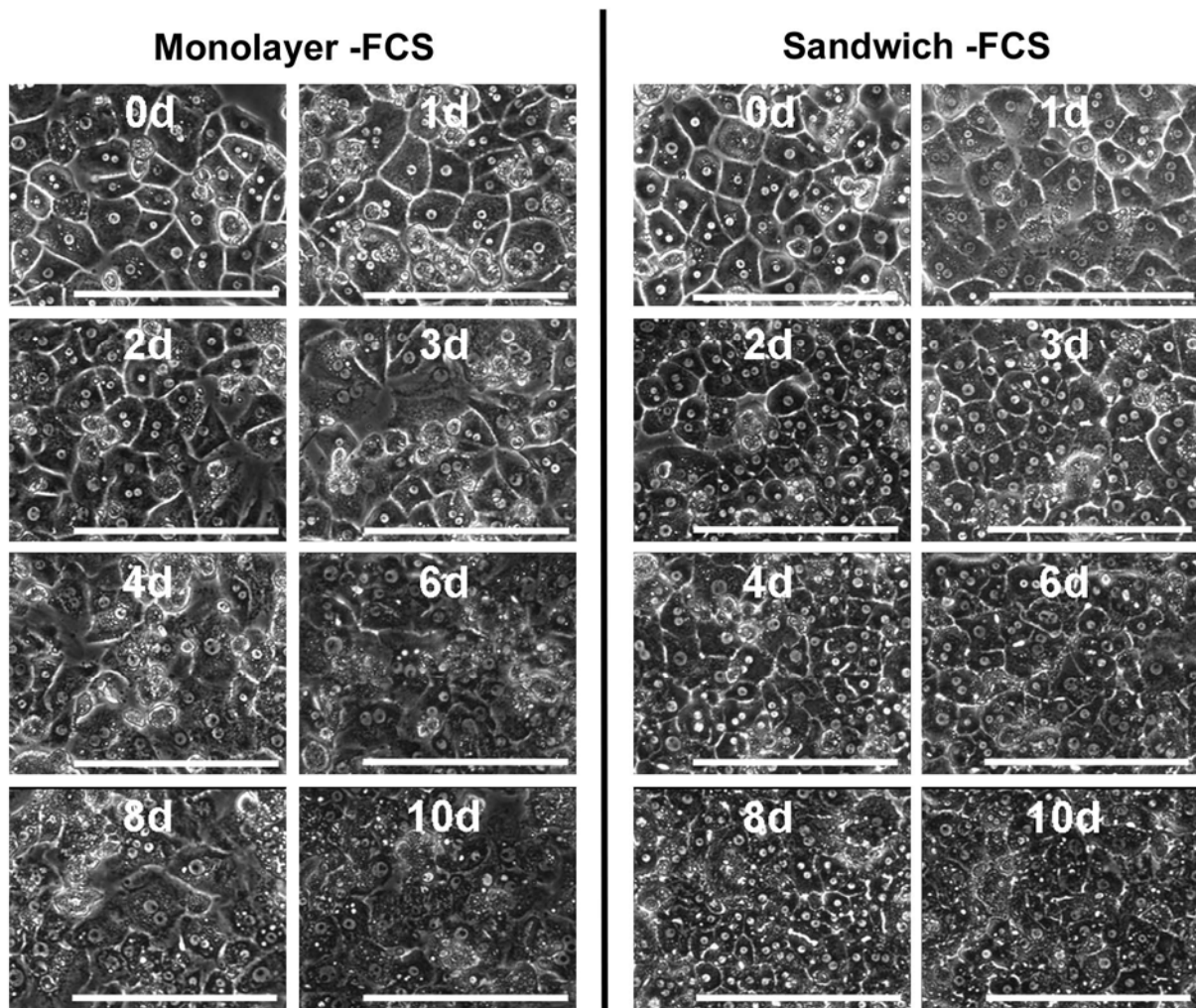
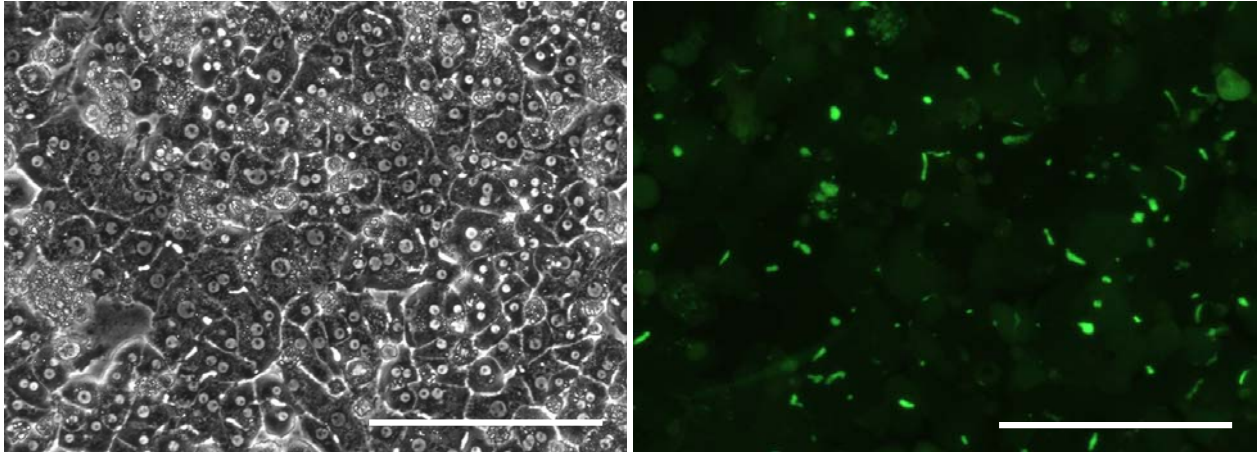


Abbildung 6.1.1: Phasenkontrastaufnahmen von Monolayer- bzw. Sandwichkulturen primärer Humanhepatozyten. Die Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen (-FCS) inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten fotografiert. Der weiße Messbalken am unteren Rand der Bilder entspricht 200 µm.

Die Funktionalität der gallenkanälchenartigen Strukturen wurde durch Inkubation mit dem Fluoresceinfarbstoff Carboxy-DCFDA (5-(und-6)-Carboxy-2',7'-dichlorfluorescein-diacetat) überprüft, der passiv in die Zellen diffundiert, dort deacetyliert wird und durch den in der kanalikulären Membran lokalisierten Transporter MRP2 in die Gallenkanälchen transportiert wird. In den Sandwichkulturen konnte eine deutliche Fluoreszenzakkumulation am Ort der in den Phasenkontrastaufnahmen hell hervortretenden Zellzwischenräumen beobachtet werden; was auf das Vorliegen funktioneller Gallenkanälchen in polar differenzierten

Hepatozyten hinweg (Abbildung 6.1.2). In Monolayerkulturen primärer humaner Hepatozyten waren weder gallenkanälchenartige Strukturen noch Fluoreszenzakkumulation zu beobachten.

SW-FCS 4d



SW-FCS 8d

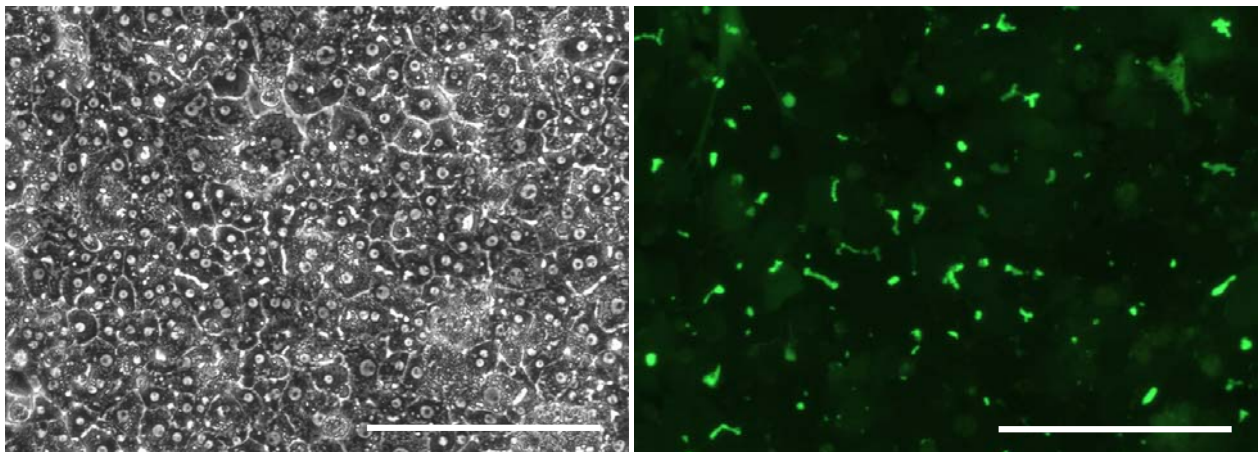


Abbildung 6.1.2:

Phasenkontrast- sowie Fluoreszenzaufnahmen von primären Humanhepatozytenkulturen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Aussaat. In serumfreien (-FCS) Sandwichkulturen (SW) wurde die Akkumulation von Carboxy-DCFDA in den gallenkanälchenartigen Strukturen untersucht. Der weiße Messbalken am unteren Rand der Bilder entspricht 200 μm .

Weiterhin sind in Abbildung 6.1.3 die Ergebnisse der Untersuchungen funktioneller Parameter in Hepatozytenkulturen von Donor 3 (s. Tabelle 6.1.1) dargestellt. Da die Ergebnisse für die Zellkulturen der drei Donoren zwar insgesamt einen ähnlichen Verlauf zeigten, die absoluten Werte jedoch beträchtliche Schwankungen auswiesen, wurde die Darstellung für Donor 3 exemplarisch gewählt und auf eine Mittelung der Ergebnisse verzichtet, um eine übersichtliche Darstellung der Ergebnisse zu ermöglichen. Der ATP-Gehalt war sowohl in Monolayer als auch in Sandwich relativ konstant über die Kulturdauer und wies in der Monolayerkultur insgesamt leicht erhöhte Werte auf (Abbildung 6.1.3A). Die Freisetzung von LDH aus den Zellen als Maß für die Schädigung der Integrität der

Zytoplasmamembran war zu Kulturbeginn in Monolayer stärker ausgeprägt, im weiteren Verlauf wiesen beide Kulturen sehr ähnliche Werte auf. Insgesamt konnte ein Abfall der LDH-Freisetzung innerhalb der ersten drei Tage beobachtet werden, während der übrigen Kulturdauer blieben die Werte auf niedrigem Niveau konstant (Abbildung 6.1.3B). Apoptoseinduktion war zu allen Zeitpunkten in Monolayerkulturen stärker als in Sandwichkulturen, beide Kulturen zeigten insgesamt jedoch einen ähnlichen Verlauf (Abbildung 6.1.3C). Es konnte ein Anstieg innerhalb der ersten drei (vier in Monolayer) Kulturstage beobachtet werden. Nach vorübergehendem Abfall stiegen die Werte an Tag 8 und Tag 10 erneut an. Der GSH-Gehalt in den humanen Hepatozyten lag zu allen Zeitpunkten in der Sandwichkultur höher als in der Monolayerkultur (Abbildung 6.1.3D). Mit Ausnahme von Tag 6 lagen die Werte in Monolayer auf konstant niedrigem Niveau. In der Sandwichkultur lag der GSH-Gehalt zu Beginn der Kultur nahe dem physiologischen Wert in der Leber, in den darauffolgenden Tagen lag der GSH-Gehalt deutlich über diesen Werten.

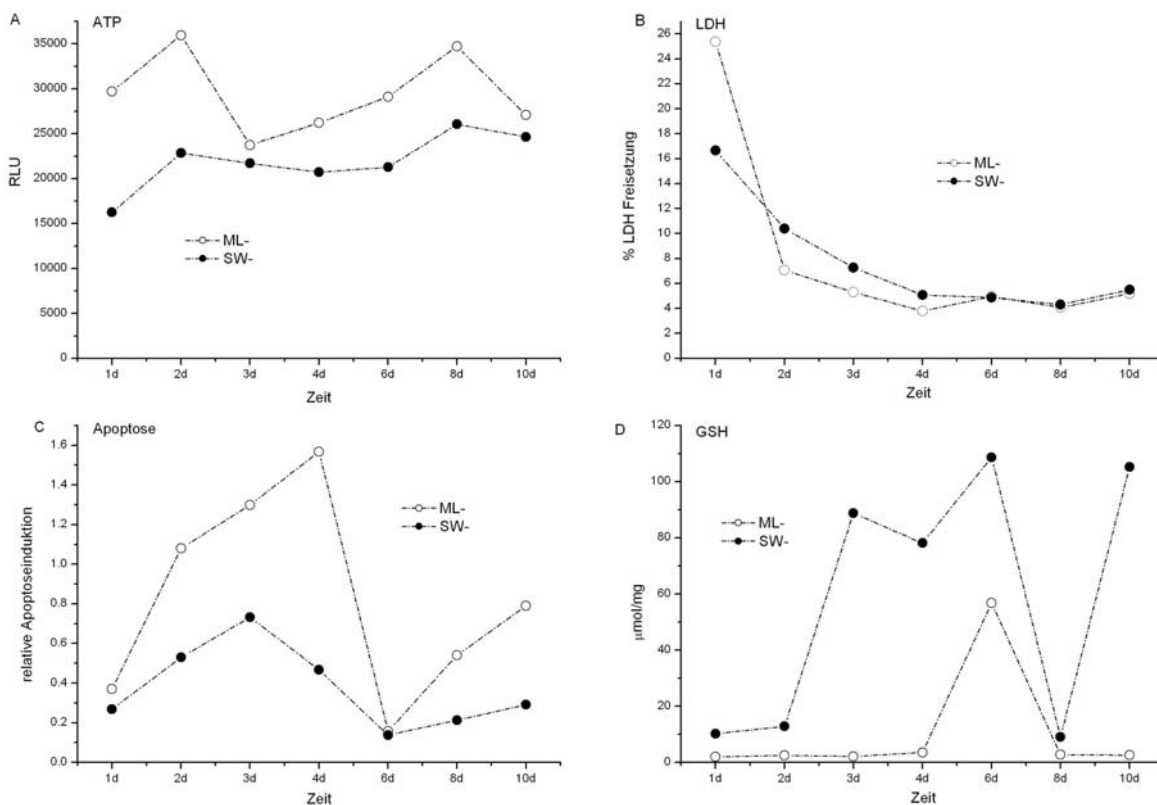


Abbildung 6.1.3:

Zellvitalität sowie funktionelle Parameter in serumfreien (-) Monolayer- (ML) bzw. Sandwich- (SW) Zellkulturen primärer Humanhepatozyten von Donor 3 (s. Tabelle 6.1.1) zu den angegebenen Zeitpunkten. A ATP – Der zelluläre ATP-Gehalt ist durch relative Lumineszenzeinheiten (RLU) dargestellt. B LDH – Als LDH-Freisetzung ist das prozentuale Verhältnis von LDH im Medium zur Summe aus LDH im Medium und im Zelllysat angegeben. C Apoptose – Apoptoseinduktion ist als Caspase 3/7 Aktivität (Apo-ONE assay) relativ zur Zellvitalität (CTB assay) dargestellt. D GSH – GSH-Gehalt der Zelle relativ zur Proteinkonzentration im Zelllysat.

Zur weiteren Charakterisierung der humanen Hepatozyten in serumfreier Monolayer- bzw. Sandwichkultur wurde die Expression von 46 Genen untersucht, die wichtige Hepatozytenfunktionen abbilden bzw. Auskunft über den Zustand der Zellen geben (Tabelle 6.1.2).

Tabelle 6.1.2: Gene die mittels Taqman™ Low Density Arrays analysiert wurden mit deren jeweiligen Taqman™ Gene Expression Assay Nummern und GenBank Accession Nummern.

Genname	Genbeschreibung	Taqman Assay Nr.	GenBank Accession Nr.
ABCB1, MDR1	ATP-Bindekassette, sub-Familie B (MDR/TAP), Mitglied 1	Hs00184500_m1	NM_000927
ABCB4, MDR3	ATP-Bindekassette, sub-Familie B (MDR/TAP), Mitglied 4	Hs00240956_m1	NM_000443
ABCC2, MRP2	ATP-Bindekassette, sub-Familie C (CFTR/MRP), Mitglied 2	Hs00166123_m1	NM_000392
ABCC3, MRP3	ATP-Bindekassette, sub-Familie C (CFTR/MRP), Mitglied 3	Hs00358656_m1	NM_003786
ACTN1	Actinin, alpha 1	Hs00241650_m1	NM_001102
ADK	Adenosin-kinase	Hs00417073_m1	NM_001123
AFP	Alpha-fetoprotein	Hs00173490_m1	NM_001134
ALB	Albumin	Hs00609411_m1	NM_000477
ALPL, AP	Alkalische Phosphatase, Leber/Niere/Knochen	Hs00758162_m1	NM_000478
CCND1	Cyclin D1	Hs00277039_m1	NM_053056
CCNG1	Cyclin G1	Hs00171112_m1	NM_004060
CDH1	Cadherin 1, Typ1, E-Cadherin (epithelial)	Hs00170423_m1	NM_004360
CDKN1A, P21	Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 1A	Hs00355782_m1	NM_000389
CEBPA	CCAAT/Enhancer Bindeprotein (C/EBP), alpha	Hs00269972_s1	NM_004364
CEBPB	CCAAT/Enhancer Bindeprotein (C/EBP), beta	Hs00270923_s1	NM_005194
CPT1A	Carnitin-palmitoyltransferase 1A (Leber)	Hs00157079_m1	NM_001031847
CYP1A2	Cytochrom P450, Familie 1, sub-Familie A, Polypeptid 2	Hs00167927_m1	NM_000761
CYP2C8	Cytochrom P450, Familie 2, sub-Familie C, Polypeptid 8	Hs00426387_m1	NM_000770
CYP2C9	Cytochrom P450, Familie 2, sub-Familie C, Polypeptid 9	Hs00426397_m1	NM_000771
CYP3A4	Cytochrom P450, Familie 3, sub-Familie A, Polypeptid 4	Hs00604506_m1	NM_017460
FABP1	Fettsäure-Bindeprotein 1, Leber	Hs00155026_m1	NM_001443
FASN	Fettsäuresynthase	Hs00188012_m1	NM_004104
FBP1	Fructose-1,6-biphosphatase 1	Hs00166829_m1	NM_000507
GADD45A	„growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha“	Hs00169255_m1	NM_001924
GSN	Gelsolin	Hs00609276_m1	NM_000177
GSTA1	Glutathion-S-transferase A1	Hs00275575_m1	NM_145740
GSTP1	Glutathion-S-transferase pi	Hs00168310_m1	NM_000852
HMOX1	Häm-oxygenase 1	Hs00157965_m1	NM_002133
HNF1A	„hepatic nuclear factor“	Hs00167041_m1	NM_000545
HNF4A	„hepatocyte nuclear factor 4, alpha“	Hs00230853_m1	NM_000457
HSPA1A	Hitzeschock 70kD Protein 1A	Hs00271229_s1	NM_005345, NM_005346
JUND	Jun D Proto-onkogen	Hs00534289_s1	NM_005354
MYC	v-myc Myelocytomatose virales Onkogen-homolog	Hs00153408_m1	NM_002467
NR1I2, PXR	Kernrezeptor sub-Familie 1, Gruppe I, Mitglied 2; Pregnan-X-Rezeptor	Hs00243666_m1	NM_003889
NR1I3, CAR	Kernrezeptor sub-Familie 1, Gruppe I, Mitglied 3; Konstitutiver Androstanrezeptor	Hs00231959_m1	NM_005122
RGN, SMP30	Regucalcin (Seneszenz-Markerprotein-30)	Hs00275889_m1	NM_004683
SLC10A1, Ntcp	„solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1“	Hs00161820_m1	NM_003049
SLCO1B1, OATP2	„solute carrier organic anion transporter family, member 1B1“	Hs00272374_m1	NM_006446
SLCO1B3, OATP8	„solute carrier organic anion transporter family, member 1B3“	Hs00251986_m1	NM_019844
SOD2	Superoxid-dismutase 2, mitochondrial	Hs00167309_m1	NM_000636
TGFA	„transforming growth factor alpha“	Hs00177401_m1	NM_003236
TGFB1	„transforming growth factor, beta 1“	Hs00171257_m1	NM_000660
TIMP1	TIMP Metallopeptidase Inhibitor 1	Hs00171558_m1	NM_003254
TNFA	Tumornekrosefaktor (TNF Super-Familie, Mitglied 2)	Hs00174128_m1	NM_000594
TXN	Thioredoxin	Hs00828652_m1	NM_003329, BC054866
UGT1A6	UDP-glycosyltransferase 1 Familie, Polypeptid A6	Hs00166592_m1	NM_001072

Die Genexpression der einzelnen Kulturen wurde relativ zur jeweiligen Leber des Donors, aus der die Zellen gewonnen wurden, untersucht und die Ergebnisse wurden für jeden Donor

separat dargestellt (Abbildung 6.1.4). Es traten deutliche Expressionsunterschiede im Vergleich zur Leber auf, die für die drei untersuchten Donoren ein ähnliches Muster zeigten, d.h. die Ergebnisse der drei Experimente waren durchaus vergleichbar.

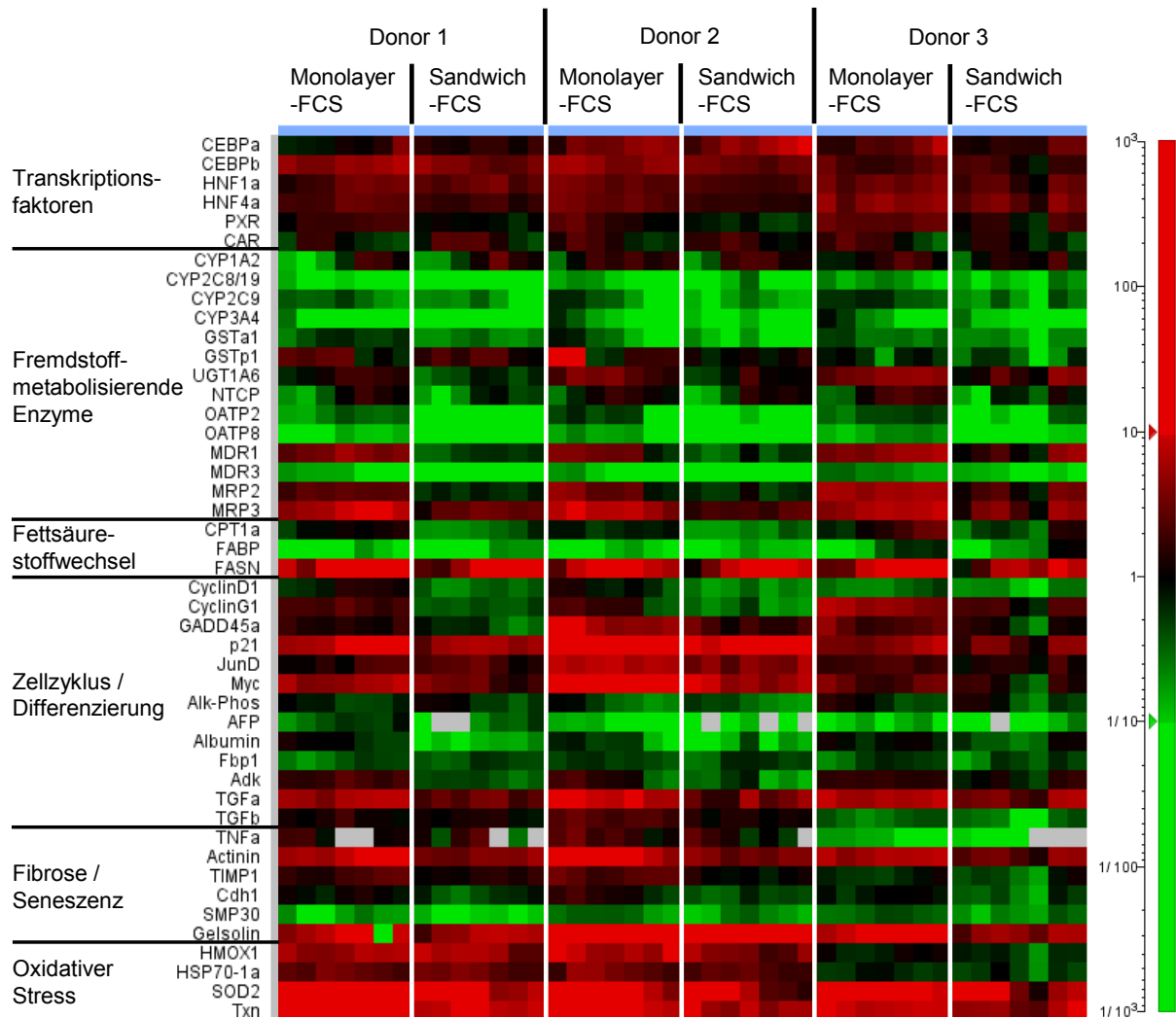


Abbildung 6.1.4: Genexpression in serumfreien (-FCS) Monolayer- bzw. Sandwich- Zellkulturen primärer Humanhepatozyten nach 1, 2, 3, 4, 6, 8, und 10 Tagen in Kultur (ansteigende Zeit jeweils von links nach rechts). Dargestellt sind die Werte der relativen Expressionsveränderungen der Gene aus drei unabhängigen Experimenten (unterschiedliche Zellpräparationen) in Bezug auf Leber in einer „heat map“. Erhöhte Expressionswerte sind in rot, verringerte in grün entsprechend dem Maßstab rechts in der Abbildung dargestellt. Die „heat map“ wurde mit dem „ANALYST“ Softwaremodul von Expressionist® (Genedata, Basel, Schweiz) erstellt. Graue Felder kennzeichnen nicht messbare Proben.

Dennoch waren für einzelne Gene Unterschiede zwischen den Donoren, aber auch zwischen den Kulturbedingungen zu beobachten. Donor 1 und 2 zeigten erhöhte Expressionswerte der Stressgene HMOX1 und HSP70, bei Donor 3 waren diese reduziert. Obwohl die Kernrezeptoren PXR und CAR nahezu unveränderte Expressionsniveaus aufwiesen, waren die durch diese regulierten CYPs 2C8, 2C9 und 3A4 deutlich reprimiert. Die kanalikulären

Transporter MDR1 und MRP2 zeigten in Monolayer erhöhte mRNA-Werte, in Sandwich blieben diese nahe den physiologischen Werten. Ebenso waren die Cycline D1 und G1 sowie GADD45 α in Monolayer hochreguliert und in Sandwich herunterreguliert. Insgesamt war der Unterschied zwischen der Monolayer- und der Sandwichkultur nicht so ausgeprägt wie im Falle der primären Rattenhepatozyten.

6.2 Charakterisierung der humanen Hepatomazelllinie HepaRG

Da primäre humane Hepatozyten nur in sehr begrenztem Umfang zur Verfügung stehen, und sich teilweise sehr große individuelle Unterschiede zwischen den Donoren zeigen, werden Anstrengungen unternommen differenzierte Zelllinien zu erzeugen, die eine unlimitierte Versorgung sowie robuste Ergebnisse liefern und möglichst viele physiologische Eigenschaften zeigen. Die humane Hepatomazelllinie HepaRG soll nach Anwendung eines speziellen Differenzierungsprotokolls viele dieser Eigenschaften erfüllen [Gripon *et al.*, 2002; Parent *et al.*, 2004; Aninat *et al.*, 2006]. Dabei werden die Zellen nach einer proliferativen Phase bei Erreichen der Konfluenz unter Zugabe von 2% Dimethylsulfoxid (DMSO) im Medium differenziert. Es liegen zwei unterschiedliche Zelltypen zu jeweils ca. 50% nebeneinander vor (Abbildung 6.2.1). Die größeren Zellen sind durch große Kerne, nahezu transparentes Zytoplasma und schwach definierte Zellgrenzen charakterisiert und stellen Gallenepithel-ähnliche Zellen dar. Der Hepatozyten-ähnliche Zelltyp ist kleiner, weist kleinere Kerne, klar erkennbare Nukleoli, definierte Zellgrenzen, sowie hell hervortretende Zellzwischenräume und stärker granuliertes Zytoplasma auf. Außerdem neigen die Hepatozyten-ähnlichen Zellen dazu in mehreren Schichten übereinander zu wachsen und sog. Spheroide zu bilden.

Zur Untersuchung der Zellen wurden diese für zehn Tage entsprechend den vom Hersteller (Biopredic International, Rennes, Frankreich) zur Verfügung gestellten Protokollen und Medien zum einen in dem mit 2% DMSO versetzten Differenzierungsmedium und zum anderen in DMSO-freiem Basalmedium inkubiert. Alle weiteren Behandlungen und Analysen wurden unter identischen Bedingungen wie für die Ratten- bzw. Humanhepatozytenkulturen durchgeführt (s. Anhang 2). Morphologisch zeigten die HepaRG-Zellen im Beobachtungszeitraum nur sehr geringe Veränderungen über die Zeit und zwischen den beiden Medienzusammensetzungen. Lediglich die Spheroidbildung nahm in beiden Fällen über die Zeit etwas zu. Ebenso das Vorhandensein von gallenkanälchenartigen Strukturen war sowohl mit als auch ohne DMSO zu beobachten und die Funktionalität der Gallenkanälchen konnte während der gesamten Inkubationsdauer nachgewiesen werden; ein Beispiel ist in Abbildung 6.2.2 dargestellt.

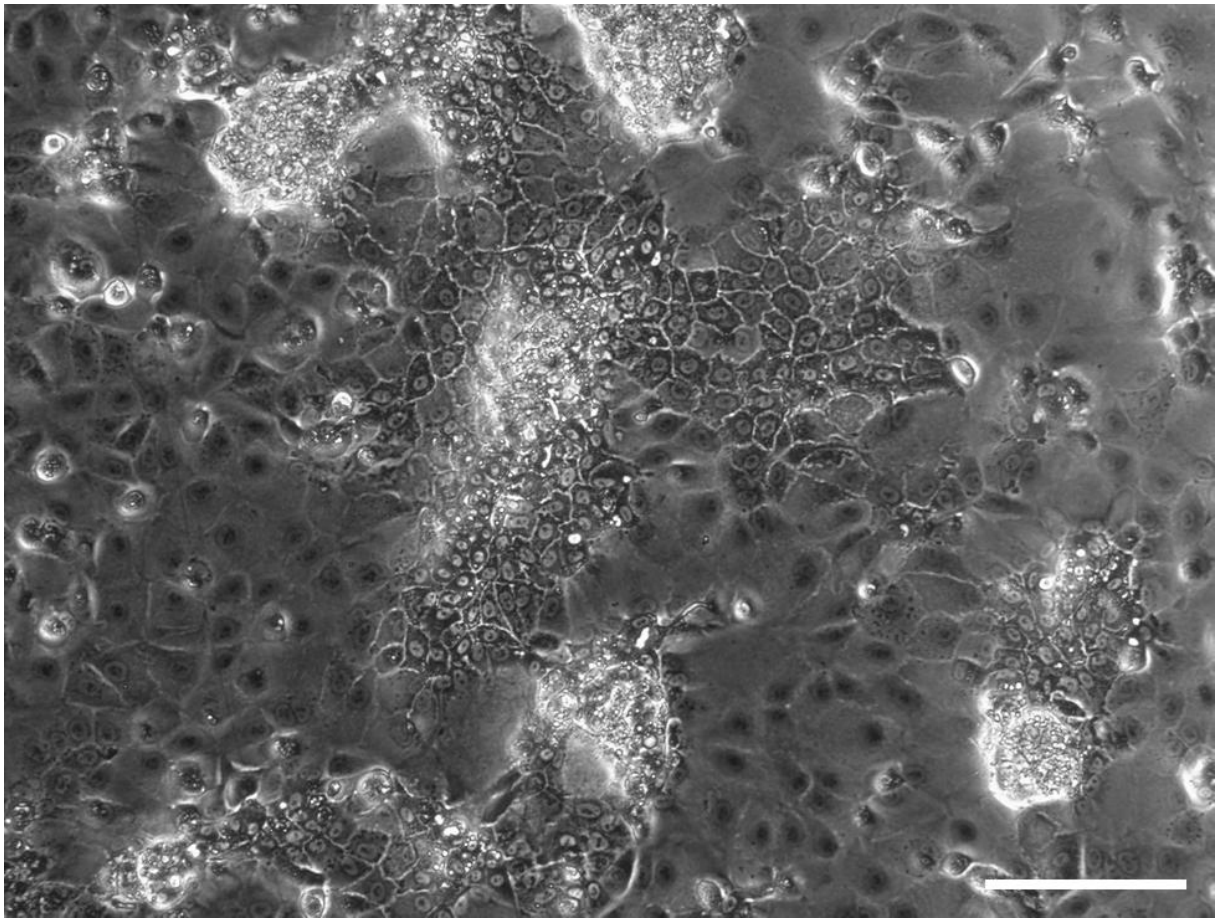


Abbildung 6.2.1: Phasenkontrastaufnahme von HepaRG-Zellen. Der weiße Messbalken am unteren Rand der Bilder entspricht 200 μm .

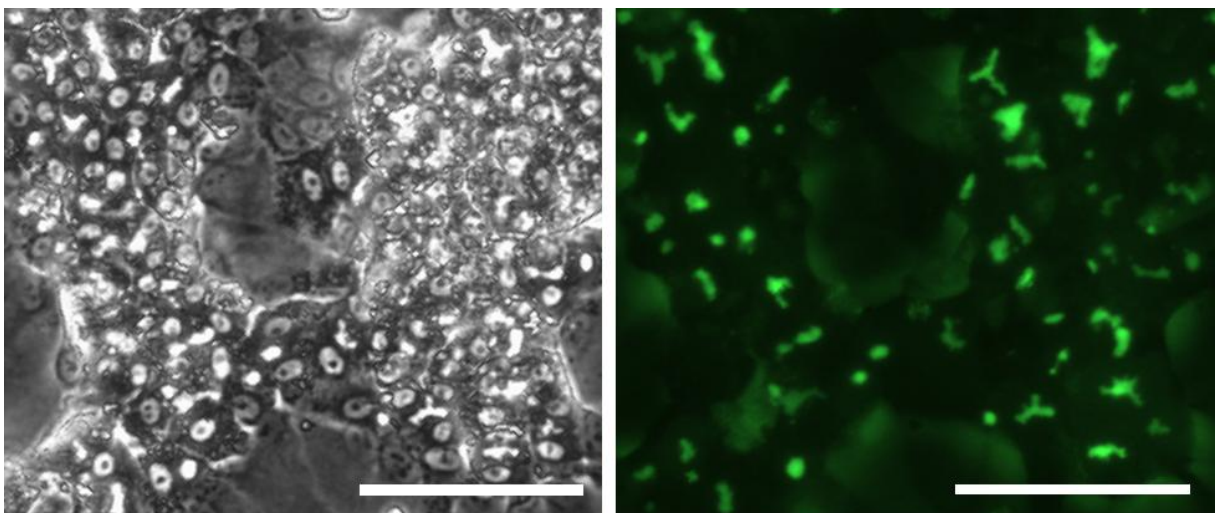


Abbildung 6.2.2: Phasenkontrast- sowie Fluoreszenzaufnahme von HepaRG-Zellen. Es wurde die Akkumulation von Carboxy-DCFDA in den gallenkanälchenartigen Strukturen untersucht. Der weiße Messbalken am unteren Rand der Bilder entspricht 200 μm .

Für die HepaRG-Zellen wurden ebenfalls verschiedene funktionelle Parameter in Abhängigkeit von Inkubationsdauer und Medienzusammensetzung untersucht (Abbildung 6.2.3). Der ATP-Gehalt der Zellen zeigte in beiden Kulturen einen parallel und auf gleichem Niveau verlaufenden Abfall bis Tag 4 auf etwa die Hälfte der Ausgangswerte und anschließend einen erneuten Anstieg bis Tag 10, erreichte jedoch nicht ganz die Ausgangswerte (Abbildung 6.2.3A). Die Freisetzung von LDH aus den Zellen war in DMSO-haltigem Medium mit leichten Schwankungen relativ konstant, im Basalmedium war im Laufe der Zeit ein leichter Anstieg zu beobachten (Abbildung 6.2.3B).

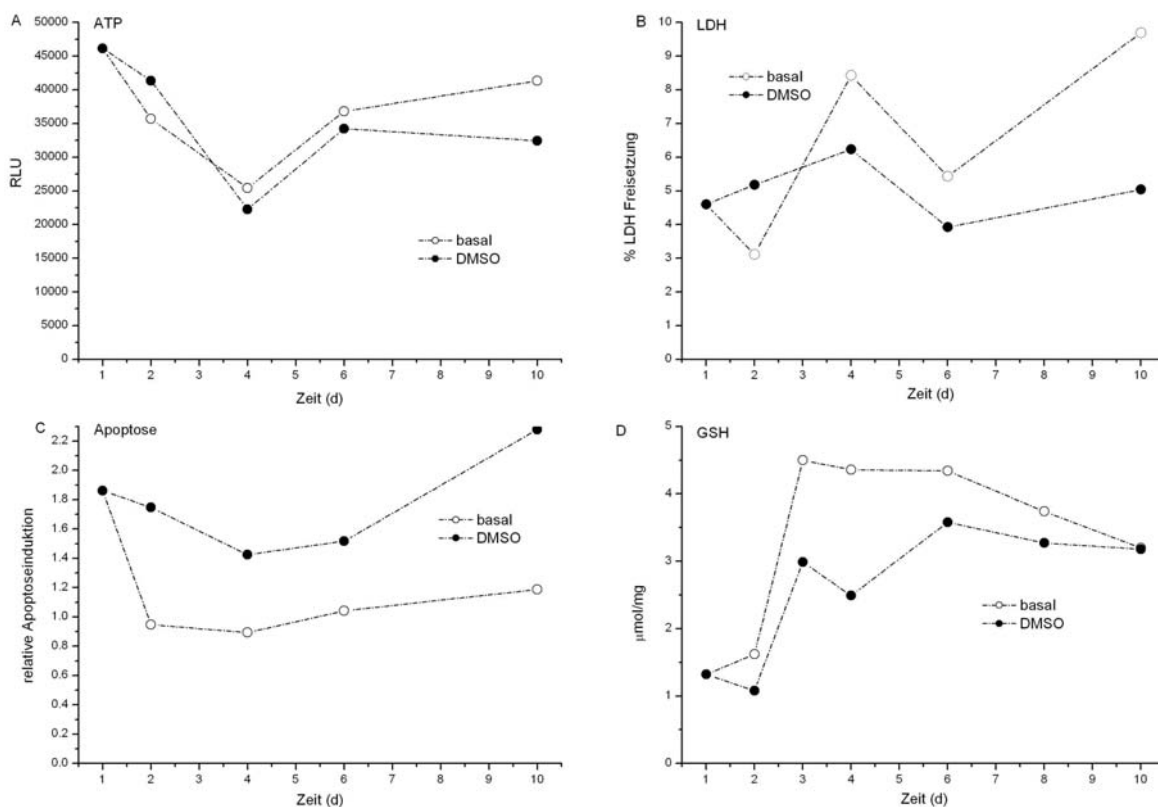


Abbildung 6.2.3:

Zellvitalität sowie funktionelle Parameter in HepaRG-Zellen in DMSO-haltigem (DMSO) bzw. DMSO-freiem (basal) Medium zu den angegebenen Zeitpunkten. A ATP – Der zelluläre ATP-Gehalt ist durch relative Lumineszenzeinheiten (RLU) dargestellt. B LDH – Als LDH-Freisetzung ist das prozentuale Verhältnis von LDH im Medium zur Summe aus LDH im Medium und im Zelllysat angegeben. C Apoptose – Apoptoseinduktion ist als Caspase 3/7 Aktivität (Apo-ONE assay) relativ zur Zellvitalität (CTB assay) dargestellt. D GSH – GSH-Gehalt der Zelle relativ zur Proteinkonzentration im Zelllysat.

Die relative Apoptoseinduktion war zeitlich in beiden Kulturen nahezu konstant, wies in DMSO-haltigem Medium jedoch um 1,5-fach bis 2-fach höhere Werte auf als in Basalmedium (Abbildung 6.2.3C). Der GSH-Gehalt in HepaRG war zu Kulturbeginn sehr gering. Ab dem dritten Tag zeigten sich deutlich erhöhte Werte, die bis zum Ende der Beobachtungszeit erhalten blieben (Abbildung 6.2.3D).

Bei Betrachtung der Genexpressionsunterschiede in den HepaRG-Kulturen im Vergleich zu menschlicher Leber konnten für nahezu alle der in Tabelle 6.1.2 aufgelisteten Gene ausgeprägte Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 6.2.4). Mit sehr wenigen Ausnahmen war das Expressionsmuster im Basal- bzw. DMSO-Medium nahezu identisch. Durch die Wegnahme von DMSO wies CYP3A4 stark verringerte mRNA-Werte auf. Im Gegensatz dazu war die Alkalische Phosphatase- und FABP-Expression erhöht.

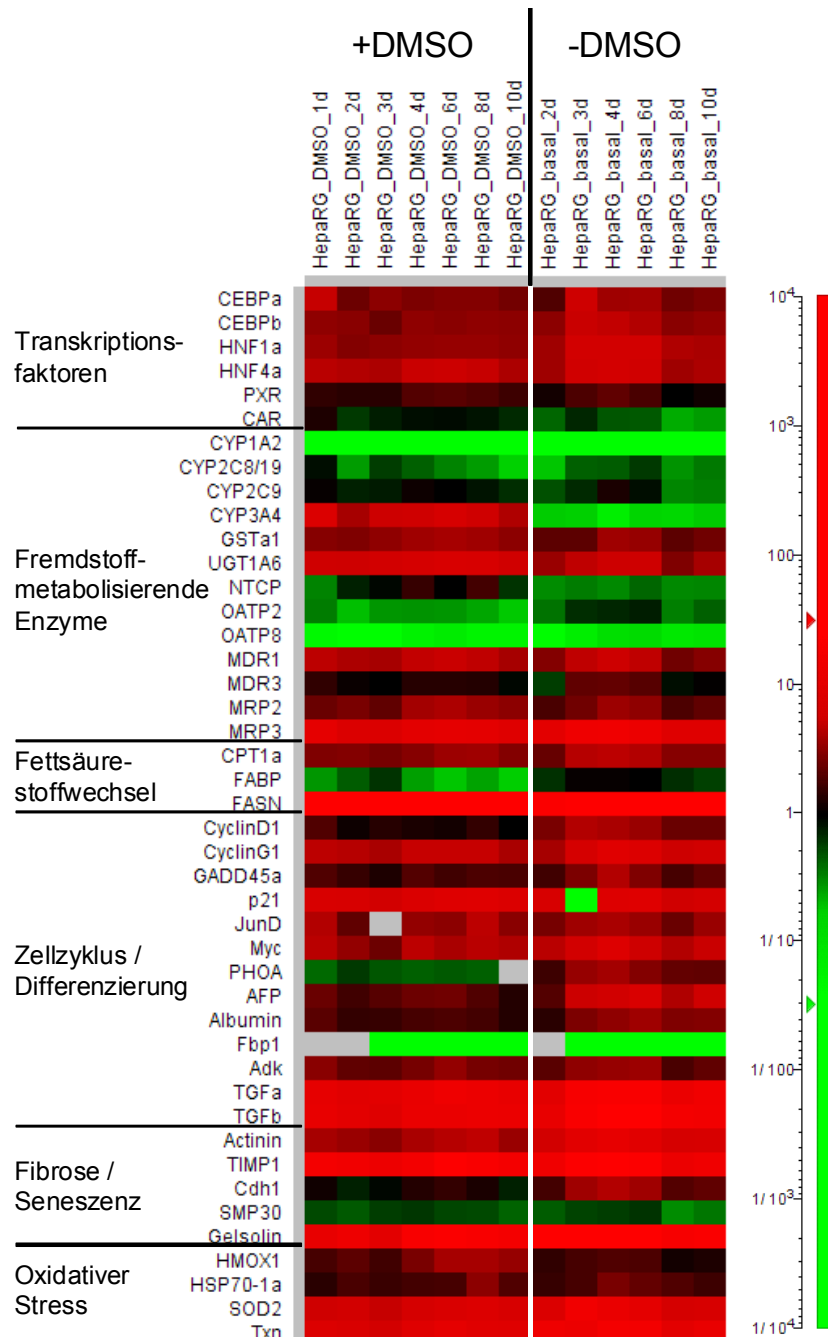


Abbildung 6.2.4:

Genexpression in HepaRG-Zellen in DMSO-haltigem bzw. DMSO-freiem Medium zu den angegebenen Zeitpunkten. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Expressionsveränderungen der Gene aus drei unabhängigen Experimenten in Bezug auf Leber in einer "heat map". Erhöhte Expressionswerte sind in rot, verringerte in grün entsprechend dem Maßstab rechts in der Abbildung dargestellt. Die „heat map“ wurde mit dem „ANALYST“ Softwaremodul von Expressionist® (Genedata, Basel, Schweiz) erstellt. Graue Felder kennzeichnen nicht messbare Proben.

6.3 Vergleich verschiedener Leber-Kulturmodelle

6.3.1 Genexpression in Ratten-Leber-*in vitro*-Modellen

Wie bereits erwähnt, gibt es eine Vielzahl von Leber-*in vitro*-Modellen, die für unterschiedliche Anwendungen zum Einsatz kommen. Um Anhaltspunkte darüber zu bekommen, inwieweit sich verschiedene Kultursysteme unterscheiden, wurde die Expression der in Anhang 2 aufgelisteten Gene unter unterschiedlichen Inkubationsbedingungen im Vergleich zur Leber *in vivo* untersucht (Abbildung 6.3.1.1). Generell war zu beobachten, dass das Expressionsmuster in sämtlichen Kulturen unterschiedlich zur Leber war. In der frisch isolierten Hepatozytensuspension zeigten nur wenige Gene deutliche Expressionsveränderungen. CYP2B1, GADD45 α und c-Myc wiesen höhere mRNA-Werte auf als in der Leber, für TGF-beta, Gelsolin und HSP-70 waren diese geringer. Die meisten Gene wiesen eine leicht erhöhte Expression auf. Bei anschließender Inkubation der Suspensionskulturen kehrte sich dieser Effekt um und die meisten Gene wurden mit fortschreitender Dauer verstärkt reprimiert. Im Gegensatz dazu war das Expressionsniveau der größten Anzahl der Gene in Leberschnitten über dem Leberniveau. Dieser Effekt wurde mit fortschreitender Kulturdauer stärker, die Expression nach zwei Stunden war noch relativ nahe an der Leber. Bestimmte Gengruppen waren in allen Kulturen tendenziell verstärkt exprimiert, wie z. B. die zellzyklusregulierenden Gene CyclinG1, GADD45 α , p21, JunD und c-Myc oder Markergene für Fibrose/Seneszenz bzw. oxidativen Stress. Die Expression von CYP1A2 ließ grundsätzliche Unterschiede zwischen Kultivierungstypen erkennen; in Suspensionskulturen und Leberschnitten traten erhöhte mRNA-Werte auf, in adhärennten Zellkulturen waren diese verringert.

Um einen besseren Eindruck von dem relativen Verhältnis der *in vitro*-Lebermodelle zueinander zu bekommen, wurden die Genexpressionsunterschiede der Abbildung 6.3.1.1 in einer Prinzipiellen Komponentenanalyse dargestellt (Abbildung 6.3.1.2). Die Prinzipielle Komponentenanalyse (PCA) ist eine Methode die Dimensionalität eines Datensatzes zu reduzieren um damit die Daten anschaulicher darstellen zu können [Yeung und Ruzzo, 2001]. Dazu werden die Daten auf neue Variablen, die prinzipiellen Komponenten, transformiert. Diese Variablen/Komponenten sind unabhängig voneinander und werden aufsteigend in der Reihenfolge sortiert die die größte Unterscheidung der Daten erlaubt. Die Darstellungen in den Abbildungen 6.3.1.2 und 6.3.2.2 erfolgte in einem dreidimensionalen Raum anhand der ersten drei Komponenten mit den größten Unterscheidungsmerkmalen. In Abbildung 6.3.1.2 ist zusätzlich eine Zeitachse eingefügt, diese entspricht keiner der Komponenten sondern ergab sich aus dem zeitlichen Verlauf der Datenpunkte für die meisten der dargestellten Kultursysteme.

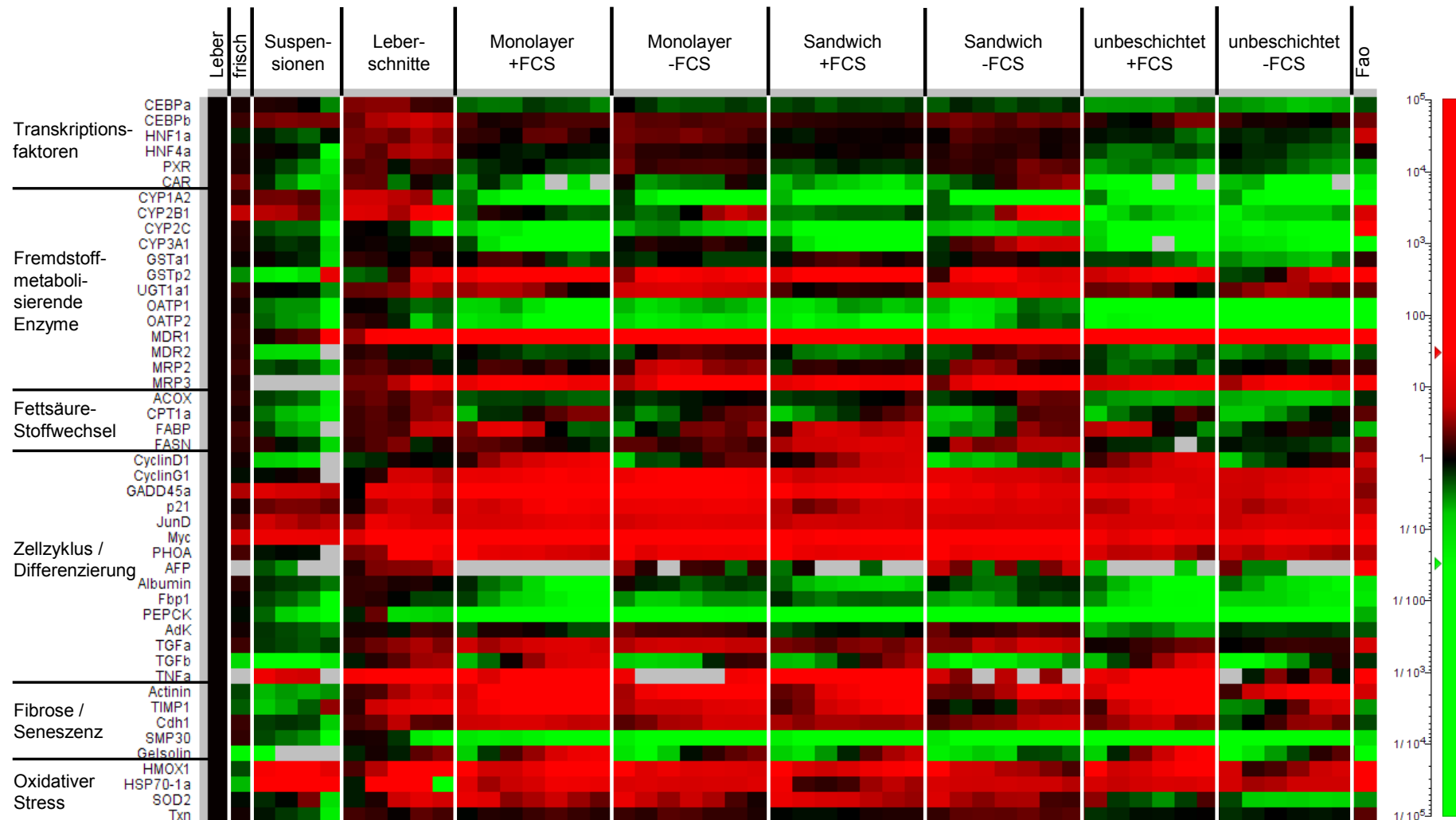


Abbildung 6.3.1.1:

Genexpression in Leber, Leberschnitten (nach 0, 2, 6, 24 und 48 h), frisch isolierter Hepatozytensuspension, Fao-Zellen, Suspensionskulturen (nach 2, 4, 6 und 24 h), sowie serumfreien (-FCS) oder serumhaltigen (+FCS) Collagen-Monolayer-, Collagen-Sandwich- bzw. unbeschichteten Zellkulturen (nach 1, 2, 3, 4, 6, 8 und 10 d) primärer Rattenhepatozyten (ansteigende Zeit jeweils von links nach rechts). Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Expressionsveränderungen der Gene aus drei unabhängigen Experimenten (unterschiedliche Zellpräparationen) in Bezug auf Leber in einer „heat map“. Erhöhte Expressionswerte sind in rot, verringerte in grün entsprechend dem Maßstab rechts in der Abbildung dargestellt. Die „heat map“ wurde mit dem „ANALYST“ Softwaremodul von Expressionist® (Genedata, Basel, Schweiz) erstellt. Graue Felder kennzeichnen nicht messbare Proben.

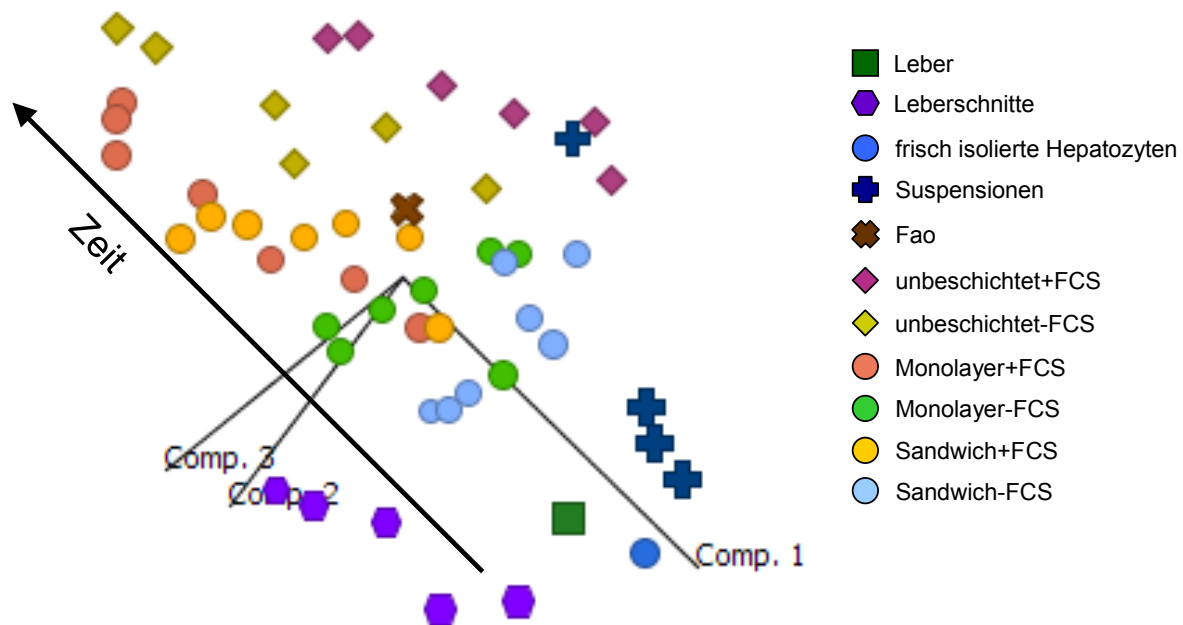


Abbildung 6.3.1.2:

Genexpression in Leber, Leberschnitten (nach 0, 2, 6, 24 und 48 h), frisch isolierter Hepatozytensuspension, Fao-Zellen, Suspensionskulturen (nach 2, 4, 6 und 24 h), sowie serumfreien (-FCS) oder serumhaltigen (+FCS) Collagen-Monolayer-, Collagen-Sandwich- bzw. unbeschichteten Zellkulturen (nach 1, 2, 3, 4, 6, 8 und 10 d) primärer Rattenhepatozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Expressionsveränderungen der Gene in Abbildung 6.3.1.1 aus drei unabhängigen Experimenten (unterschiedliche Zellpräparationen) in Bezug auf Leber in einer Prinzipiellen Komponentenanalyse (PCA). Die PCA wurde mit dem "ANALYST" Softwaremodul von Expressionist® (Genedata, Basel, Schweiz) erstellt.

Dabei zeigte sich erneut die Ähnlichkeit der frisch isolierten Hepatozytensuspension, der frühen Zeitpunkte der Suspensionskulturen und der Leberschnitte zur Leber. Mit fortschreitender Inkubationsdauer entfernten sich die Suspensionen und die Leberschnitte deutlich von der *in vivo*-Situation. Dieser zeitliche Verlauf ergab sich interessanterweise auch für die serumhaltigen und unbeschichteten, nicht jedoch für die serumfreien adhärennten Zellkulturen. Die Zellkulturen waren bereits zu Beginn der Inkubationsperiode weiter entfernt von der Leber, den geringsten, und einen zeitlich konstanten Abstand, wies die serumfreie Sandwichkultur primärer Rattenhepatozyten auf.

6.3.2 Genexpression in humanen Leber-*in vitro*-Modellen

Anhand der Genexpressionsunterschiede der in Tabelle 6.1.2 aufgeführten Gene im Vergleich zu Leber, wurden die bereits dargestellten Monolayer- bzw. Sandwichkulturen primärer humaner Hepatozyten und HepaRG-Zellkulturen mit Suspensionskulturen primärer humaner Hepatozyten und der Hepatomazelllinie HepG2 verglichen (Abbildung 6.3.2.1) In den Suspensionskulturen waren zu Beginn der Inkubation nahezu alle Gene verstärkt exprimiert. Insgesamt waren in den ersten sechs Stunden der Suspensionskulturen die meisten Gene nur zu einem geringen Ausmaß dereguliert; Ausnahmen waren die

zunehmende Expression Oxidativer-Stress-Gene, sowie von TNF-alpha und c-Myc und deutliche verringerte mRNA-Werte von GSTp1. Ebenso wie im Falle der Rattenhepatozytensuspensionen, unterschied sich der 24 h-Wert deutlich von den frühen Zeitpunkten. Ein weiterer Aspekt, der bei Ratten und humanen *in vitro*-Modellen identisch war, war die verstärkte Expression der Gene für oxidativen Stress und die zellzyklus-regulierenden Gene CyclinG1, GADD45 α , p21, JunD und c-Myc in sämtlichen Kulturen. Vor allem in den adhärennten Kulturen war eine Repression der fremdstoffmetabolisierenden Gene zu beobachten, welche in den humanen Hepatozyten stärker ausgeprägt war als in HepaRG.

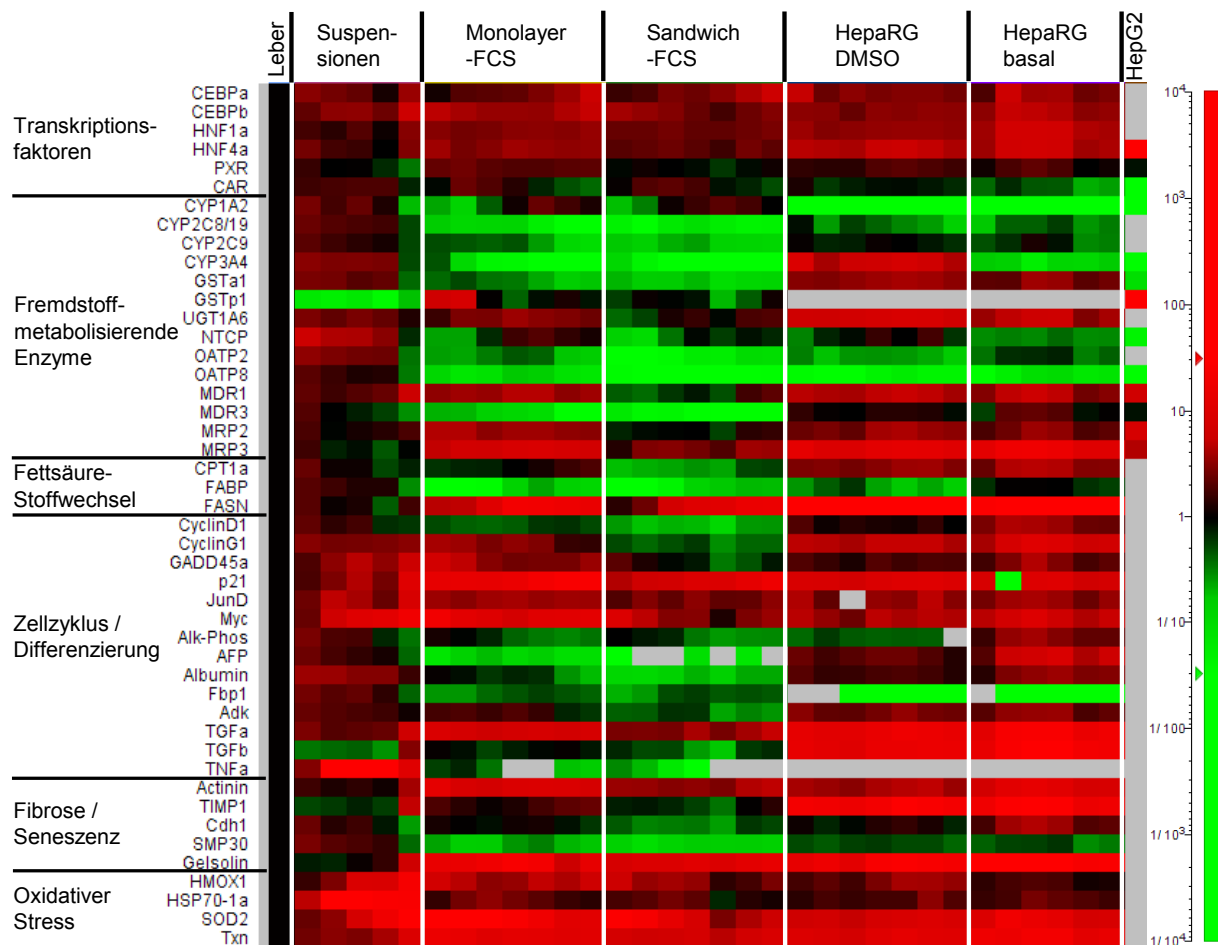


Abbildung 6.3.2.1:

Genexpression in Leber, Suspensionskulturen (nach 0, 2, 4, 6 und 24 h), serumfreien (-FCS) Collagen-Monolayer- oder Collagen-Sandwichkulturen (nach 1, 2, 3, 4, 6, 8 und 10 d) primärer Humanhepatozyten sowie HepaRG-Zellen in DMSO-haltigem (DMSO) bzw. DMSO-freiem (basal) Medium (nach 1, 2, 3, 4, 6, 8 und 10 d) und HepG2-Zellen (ansteigende Zeit jeweils von links nach rechts). Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Expressionsveränderungen der Gene aus drei unabhängigen Experimenten (unterschiedliche Zellpräparationen) in Bezug auf Leber in einer "heat map". Erhöhte Expressionswerte sind in rot, verringerte in grün, entsprechend dem Maßstab rechts in der Abbildung, dargestellt. Die „heat map“ wurde mit dem "ANALYST" Softwaremodul von Expressionist® (Genedata, Basel, Schweiz) erstellt. Graue Felder kennzeichnen nicht messbare Proben.

Die relative Beziehung der Kulturmodelle untereinander, auf Grundlage der in Abbildung 6.3.2.1 dargestellten Genexpressionsunterschiede zu Leber, wurde in einer Prinzipiellen Komponentenanalyse dargestellt (Abbildung 6.3.2.2). Es zeigte sich, wie im Falle der Rattenhepatozyten, dass die frühen Zeitpunkte der Suspensionskulturen die geringsten Unterschiede zur Leber aufwiesen. Nach 24-stündiger Inkubation war die Genexpression deutlich verändert. In den adhärenenten Kulturen war eine geringe zeitliche Veränderung zu beobachten. Die humanen Hepatomazellen (HepG2) zeigten sich deutlicher von den übrigen Zellkulturen separiert als im Vergleich dazu die Rattenhepatomazelllinie Fao. Eine Ursache dafür lag in der Tatsache, dass in HepG2 aus technischen Gründen die Expression vieler Gene nicht untersucht werden konnte.

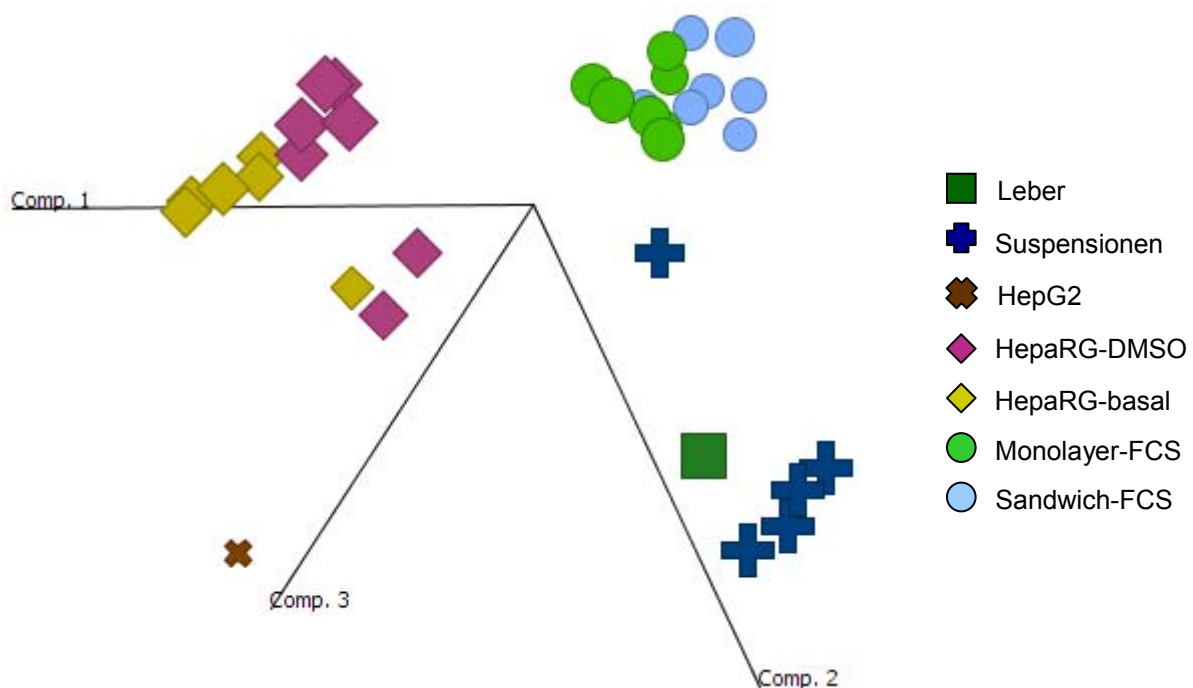


Abbildung 6.3.2.2:

Genexpression in Leber, Suspensionskulturen (nach 0, 2, 4, 6 und 24 h), serumfreien Collagen-Monolayer- oder Collagen-Sandwichkulturen (nach 1, 2, 3, 4, 6, 8 und 10 d) primärer Humanhepatozyten sowie HepaRG-Zellen in DMSO-haltigem (DMSO) bzw. DMSO-freiem (basal) Medium (nach 1, 2, 3, 4, 6, 8 und 10 d) und HepG2-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Expressionsveränderungen der Gene in Abbildung 6.3.2.1 aus drei unabhängigen Experimenten (unterschiedliche Zellpräparationen) in Bezug auf Leber in einer Prinzipiellen Komponentenanalyse (PCA). Die PCA wurde mit dem "ANALYST" Softwaremodul von Expressionist® (Genedata, Basel, Schweiz) erstellt.

Insgesamt waren die unterschiedlichen *in vitro*-Modelle deutlich voneinander getrennt. Obwohl innerhalb dieser Gruppen die Proben der verschiedenen Inkubationsbedingungen wiederum getrennt voneinander zu erkennen waren, war der Effekt der Kultivierungsbedingungen gering im Vergleich zu den unterschiedlichen Modellen.

7. DISKUSSION (ANHÄNGE 1 – 11 SOWIE KAPITEL 5.3 & 6)

Die Qualität eines *in vitro*-Modells wird häufig dadurch bemessen, inwieweit es in der Lage ist, die physiologische Situation *in vivo* nachzubilden, und ob sich die Ergebnisse auf den gesamten Organismus übertragen lassen, um damit Resultate aus *in vivo*-Experimenten vorhersagen zu können. Dies ist natürlich in starkem Maße von der Komplexität der untersuchten Vorgänge abhängig. Die Wechselwirkung zwischen einem Rezeptor und seinem Liganden oder die Aktivität einzelner Enzyme unter bestimmten Versuchsbedingungen stellen hier relativ einfache Experimente dar. Diese Ergebnisse können, isoliert betrachtet, vergleichsweise direkt zwischen *in vitro* und *in vivo* übertragen werden. Geht es allerdings um die Vorhersage von Auswirkungen auf ganze Organe, oder gar den gesamten Organismus, werden die Anforderungen an die verwendeten *in vitro*-Modelle, und das notwendige Vertrauen in die produzierten Ergebnisse, höher. Vor allem im Umfeld der toxikologischen Sicherheitsbewertung von Arzneimittelentwicklungssubstanzen ist dies ein besonders sensibles Thema. Schließlich ist das Ziel toxikologischer Prüfungen, mögliche schädigende Wirkungen für den Menschen vorherzusagen und damit auszuschließen oder gegebenenfalls eine Risiko-Nutzen-Abwägung im Rahmen der geplanten Dosierung vorzunehmen, um die sichere Anwendung eines Medikaments für den Menschen zu gewährleisten. Auf der einen Seite stehen die regulatorischen Anforderungen der Arzneimittelzulassungsbehörden, die für die Markteinführung eines Medikaments notwendigen Untersuchungen *in vivo* in Tierversuchen verschiedener Spezies durchzuführen, und natürlich das Bestreben eines Pharmaherstellers wirksame und sichere Medikamente zur Verfügung zu stellen. Auf der anderen Seite stehen vor allem wirtschaftliche Interessen der Pharmaindustrie, die sehr kostenaufwändige Arzneimittelentwicklung zu beschleunigen und Substanzen mit toxischen Effekten möglichst früh im Entwicklungsprozess zu stoppen. Hierfür könnten hauptsächlich *in vitro*-Modelle zum Einsatz kommen, da diese eine deutlich höhere Anzahl zu testender Substanzen erlauben und ethisch weniger bedenklich sind. Dennoch treten immer wieder unerwartete toxische Wirkungen bei der Anwendung in Patienten auf, die teilweise zur Rücknahme zugelassener Medikamente führen [Wysowski und Swartz, 2005]. Dies zeigt, dass Befunde aus den Spezies der präklinischen Toxizitätsstudien nicht direkt auf den Menschen übertragen werden können und dass die Hauptaufgabe der Toxikologie nicht die Bestimmung von Toxizitäten im Tier, sondern die Vorhersage möglicher toxischer Schädigungen im Menschen ist. Zur Entwicklung dieser prädiktiven Experimente könnten *in vitro*-Modelle einen wertvollen Beitrag leisten. So konnte zum Beispiel der Anteil der Arzneimittelentwicklungssubstanzen, die auf Grund von schlechter Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik scheiterten, zwischen

1991 und 2000 durch den vermehrten Einsatz von *in vitro*-Modellen von ca. 40% auf etwa 10% gesenkt werden [Kola und Landis, 2004]. Im selben Zeitraum verdoppelte sich der Anteil der Pharmazeutika, die auf Grund auftretender Toxizitäten nicht weiterentwickelt wurden, nahezu. Heute stellen die Sicherheit und die Wirksamkeit einer Substanz mit je etwa 30% die Hauptursachen für das Scheitern in der Arzneimittelentwicklung dar. Ein weiterer Aspekt ist die Tatsache, dass die Korrelation zwischen Befunden in toxikologischen Prüfungen und dem Auftreten in klinischen Studien, je nach Organsystem, teilweise verhältnismäßig gering ist [Olson *et al.*, 2000]. Zum Beispiel liegt diese für Lebertoxizität, die am häufigsten beobachtete Organtoxizität die zum Abbruch klinischer Studien oder zur Rücknahme bereits zugelassener Medikamente vom Markt führt, nur bei etwa 50% [Lee, 2003; Lee und Senior, 2005]. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit auf diesem Gebiet die Analyse von Tierversuchen zu verbessern und mit der Entwicklung von *in vitro*-Modellen die Vorhersagbarkeit arzneimittelinduzierter Lebertoxizität zu verbessern.

In den hier dargestellten Arbeiten und Ergebnissen wurden in Zellkulturen primärer Ratten- und humaner Hepatozyten die speziesspezifische Auswirkung auf die Genexpression, nach Behandlung mit den Substanzen Troglitazon, Diclofenac und EMD 392949, untersucht. Ferner wurde in den Zellkulturen die speziesspezifische Induzierbarkeit der Cytochrom P450 Enzyme analysiert. Schließlich wurden Langzeitzellkulturmodelle für primäre Hepatozyten beider Spezies charakterisiert und deren Eigenschaften in verschiedenen Kultursystemen verglichen.

Eine der Hauptursachen unterschiedlicher Wirkungen von Substanzen in verschiedenen Spezies sind Variationen in der Ausstattung fremdstoffmetabolisierender Enzyme [Hewitt *et al.*, 2007a]. Dabei können z.B. unterschiedliche Spezifitäten dazu führen, dass toxische Metaboliten nur in einer Spezies gebildet werden oder diese durch die Induktion des metabolisierenden CYPs verstärkt in einer Spezies auftreten. In den hier gezeigten Untersuchungen konnte für Diclofenac, und in stärkerem Ausmaß für Troglitazon, eine deutlich stärkere Induktion von CYP3A bzw. CYP2C und CYP3A in humanen Hepatozyten im Vergleich zu Rattenhepatozyten beobachtet werden. Dies führt zur verstärkten Bildung der toxisch wirkenden Stoffwechselprodukte und unterstreicht die höhere Suszeptibilität des Menschen bezüglich schädigender Wirkungen im Vergleich zur Ratte [Smith, 2003; Tang, 2003; He *et al.*, 2004]. Somit wird deutlich, dass eine Übertragung der Ergebnisse von den Spezies der präklinischen Untersuchungen auf den Menschen nicht immer möglich ist. Troglitazon und Diclofenac gelten auch als Beispiele für Substanzen die sog. idiosynkratische Lebertoxizität hervorrufen, die nur in einer geringen Anzahl menschlicher Individuen mit einer bestimmten Prädisposition auftritt [Boelsterli, 2003; Kaplowitz, 2005].

Dies macht eine Vorhersage im Rahmen der regulatorischen Tests unmöglich. Es wird angenommen, dass idiosynkratische Reaktionen meist in Verbindung mit Entzündungsgeschehen auftreten [Roth *et al.*, 2003; Uetrecht, 2007]. Als weitere Ursachen werden mitochondrielle Schädigungen diskutiert [Boelsterli und Lim, 2007], für eine klare Definition von Suszeptibilitätsfaktoren fehlen bisher jedoch eindeutige Beweise. Dennoch konnten durch die Behandlung von Ratten bzw. Mäusen nach vorheriger Entzündungsstimulation z.B. durch LPS (Lipopolysaccharid) Idiosynkrasie-ähnliche Leberschädigungen nachgewiesen werden [Luyendyk *et al.*, 2003; Waring *et al.*, 2006; Shaw *et al.*, 2007]. In *in vitro*-Modellen könnte die Verwendung von Co-Kulturen primärer Hepatozyten und Kupfferzellen, als Entzündungsvermittler, einen Zugang zur Detektion idiosynkratischer Reaktionen ermöglichen.

Um die Vorhersagekraft von Tierstudien zu verbessern oder speziesspezifische Sachverhalte aufzuklären bzw. bei der Bewertung von biologischen Pharmazeutika werden toxikologische Untersuchungen in dem Menschen näher verwandten Arten wie z.B. Primaten, und hier vor allem der Art *Macaca fascicularis*, durchgeführt. Trotz ethischer und wirtschaftlicher Einschränkungen werden diese Studien bei bestimmten Fragestellungen eingesetzt und finden zum Beispiel bei der Testung biologischer Wirkstoffe Anwendung im Routinebetrieb. Die Arzneimittelentwicklungssubstanz EMD 392949 ist ein PPAR α/γ -Agonist zur Behandlung von Typ II Diabetes. Substanzen, die den Kernrezeptor PPAR α und dadurch die Transkription von ihm regulierter Gene aktivieren, verursachen in Nagern Lebertumore, die im Menschen jedoch nicht auftreten [Roberts *et al.*, 2002]. Daher ist es möglich PPAR α -Agonisten als sichere Medikamente für den Menschen zu entwickeln und durch die Untersuchung der Substanz in Nagern bzw. Nichtnagern kann diese speziesspezifische Wirkung bestätigt werden. EMD 392949 zeigte eine erhöhte Stoffwechselrate in Affen, nicht jedoch in der Ratte. Die Untersuchung der Aktivität sowie der mRNA-Expression der wichtigsten fremdstoffmetabolisierenden CYPs zeigte die Induktion von CYP2C und CYP3A ausschließlich in Affen und untermauerte diese Annahme. Die Behandlung primärer Ratten- bzw. humaner Hepatozytenkulturen mit EMD 392949 bestätigten die Ergebnisse aus den Ratten- bzw. Affen-*in vivo*-Studien. Dies bedeutet, dass in diesem Fall der Affe prädiktiv für die Befunde im Menschen war. Ebenso waren hier für die Untersuchung der Aktivierung des Fremdstoffmetabolismus bzw. PPAR-spezifischer Zielgene die Zellkulturen primärer Hepatozyten sowohl für die Ratte als auch im Vergleich Affe – Mensch prädiktiv für die Ergebnisse der *in vivo*-Studien.

In der Tat sind Zellkulturen primärer Hepatozyten heute das Mittel der Wahl zur Untersuchung von speziesspezifischen Arzneimittelwechselwirkungen durch CYP-Induktion

[Hewitt *et al.*, 2007a]. Die Bewertung der Ergebnisse hat sich in den letzten Jahren in der Hinsicht gewandelt, dass als Resultat nicht mehr das Vielfache der unbehandelten Lösemittelkontrolle angegeben wird, sondern entsprechend den Richtlinien der FDA die Induktion relativ zu einer für jedes CYP und jede Spezies spezifischen Positivsubstanz [Hewitt *et al.*, 2007b]. Dabei wird eine Erhöhung um mehr als 40% der Positivkontrolle als relevante Induktion angenommen. Diese Art der Bewertung ermöglicht es, auch die Ergebnisse aus Hepatozytenkulturen unterschiedlicher menschlicher Donoren besser beurteilen zu können. Im Gegensatz zu den aus kontrollierter Zucht stammenden Labortieren ist die Variation zwischen menschlichen Individuen naturgegeben um ein Vielfaches größer [Aldridge *et al.*, 2003]. Die Aktivität der CYPs liefert die relevanteste Aussage über den Stoffwechsel einer Substanz. Die hier präsentierten Daten haben gezeigt, dass bei der Anwendung des beschriebenen Bewertungsschemas die Induktion der mRNA vergleichbare Ergebnisse zu den Aktivitätsbestimmungen liefert. Neben der Möglichkeit einen höheren Probendurchsatz zu erreichen, können durch die Genexpressionsanalyse neben den CYPs auch Enzyme der Phasen II und III des Fremdstoffmetabolismus sowie die regulierenden Transkriptionsfaktoren in einem Experiment untersucht werden. Dies ist besonders wichtig, da Arzneimittelwechselwirkungen, z.B. auch durch einen erhöhten oder verminderten Transport einer Substanz oder eines Stoffwechselprodukts, hervorgerufen werden können bzw. Substanzen sowohl als Induktor als auch als Inhibitor unterschiedlicher Enzyme wirken können [Hewitt *et al.*, 2007b; Tachibana *et al.*, 2011]. Die Analyse veränderter Genexpression könnte daher im Rahmen eines ersten Screenings ein aussagekräftiger Endpunkt zur Untersuchung von Arzneimittelwechselwirkungen sein [Fahmi *et al.*, 2010]. Im weiteren Verlauf der Arzneimittelentwicklung könnten diese Ergebnisse für ausgewählte Substanzen durch CYP-Aktivitätsbestimmungen bestätigt werden.

Zur Untersuchung der Effekte nach Behandlung primärer Hepatozytenkulturen mit Diclofenac, Troglitazon, EMD 392949 bzw. zur Untersuchung der CYP-Induktion wurden die Ratten- bzw. humanen Zellen für maximal 72 Stunden mit den Substanzen inkubiert. Für diese Studien wurden die Hepatozyten als Collagen-Monolayer kultiviert, deren maximale Behandlungsdauer auf 72 Stunden begrenzt ist, da die Hepatozyten einem Dedifferenzierungsprozess unterworfen sind [Elaut *et al.*, 2006a]. Dennoch zeigten die Ergebnisse eindeutig, dass bei der Analyse bestimmter Parameter diese Kulturen wertvolle und auf die *in vivo*-Situation übertragbare Resultate lieferten. Um komplexere Vorgänge zu untersuchen bzw. detailliertere toxikologische Aussagen zu erhalten, die z. B. Rückschlüsse auf den toxischen Mechanismus einer Substanz erlauben, werden Kulturmodelle entwickelt, die die physiologischen Eigenschaften besser widerspiegeln. Dafür müssen die Hepatozyten über einen längeren Zeitraum in einem differenzierten Zustand erhalten werden, um die

Behandlungsdauer ausdehnen zu können. Anhand der hier gezeigten Daten erwies sich die Kultivierung primärer Rattenhepatozyten unter serumfreien Bedingungen und in einem Sandwich zweier hydratisierter Collagengelschichten als geeignete Langzeitkultur. Die stabile Morphologie der Sandwichkulturen eröffnet den Zugang zu bildbasierten Analysemethoden und könnte damit eine Verbindung zu klassischen toxikologischen Untersuchungsmethoden, wie der Histopathologie, ermöglichen bzw. den Zugang zu neuen Verfahren wie der High Content Imaging (HCI) Analyse. Ein weiteres Merkmal, das in Monolayerkulturen nicht zu beobachten ist, ist die Ausbildung gallenkanälchenartiger Strukturen. Dies stellt einen Beweis für die polare Differenzierung der Hepatozyten in der serumfreien Sandwichkultur dar. Das ermöglicht eine funktionelle Untersuchung der Transporteraktivitäten in Hepatozyten und erweitert das Spektrum der Endpunkte zur Analyse des Fremdstoffmetabolismus über die CYPs hinaus [Marion *et al.*, 2007]. In der serumfreien Sandwichkultur wurden höhere basale CYP-Aktivitäten beobachtet und hier war im Gegensatz zur Monolayerkultur auch eine Induktion der Aktivität nach mehrtägiger Kulturdauer zu sehen [De Smet *et al.*, 2001]. Hier erwies sich erneut die Analyse der mRNA als sensitivere Methode, denn dadurch konnte sowohl in Monolayer als auch im Sandwich eine Induktion aller untersuchten CYPs, bis zur maximal untersuchten Kulturdauer von zehn Tagen, nachgewiesen werden. Dennoch sollte bedacht werden, dass die relevanteste Information zum Stoffwechsel einer Substanz die CYP-Aktivität darstellt. Das heißt, die mRNA-Analyse kann nur als Ersatz für die Aktivitätsbestimmung eingesetzt werden, wenn tatsächlich eine Korrelation zwischen den Methoden besteht. Dies trifft für Monolayer nur bis zu einer Inkubationsdauer von 72 Stunden zu, für die serumfreie Sandwichkultur besteht diese Korrelation mindestens bis zu Tag 10 in Kultur.

Die Expression einer Reihe hepatozytenspezifischer Gene unterschied sich in der serumfreien Sandwichkultur, wie in allen übrigen Kulturen auch, deutlich von derjenigen in der Leber [Richert *et al.*, 2006], war dieser jedoch insgesamt am nächsten und im zeitlichen Verlauf am konstantesten. Diese Tatsache ermöglicht die Identifizierung substanzinduzierter Genexpressionsveränderungen und dadurch eine mögliche Identifizierung toxischer Substanzen anhand eines bestimmten Genexpressionsprofils. Ebenso könnten dadurch Hinweise für die Aufklärung des Mechanismus der toxischen Wirkung gewonnen werden [Schug *et al.*, 2008].

Die positiven Auswirkungen auf Differenzierungsgrad und Lebensdauer der primären Rattenhepatozyten in serumfreier Sandwichkultur zeigten sich ebenso bei Anwendung dieser Kulturmethode auf primäre humane und Maus-Hepatozyten [Godoy *et al.*, 2009]. Insgesamt waren die Unterschiede zwischen Monolayer und Sandwich im Falle der humanen Hepatozyten jedoch geringer ausgeprägt als für Rattenhepatozyten. Humane Hepatozyten erlauben natürlich eine möglichst direkte Vorhersage von Substanzwirkungen im Menschen,

allerdings ist die Verfügbarkeit der Zellen naturgemäß stark begrenzt [Richert *et al.*, 2004]. Eine Möglichkeit, dies zu umgehen, ist die transiente Veränderung primärer humaner Hepatozyten, um diese vorübergehend in einen proliferativen Zustand zu versetzen, der eine Expansion der Zellen erlaubt (Medicyte GmbH, Heidelberg, Deutschland). Eine weitere Möglichkeit ist, wie im Falle der HepaRG-Zellen, die Überführung einer Hepatomazelllinie in einen den primären Hepatozyten ähnlicheren differenzierten Zustand durch spezielle Inkubationsbedingungen [Cerec *et al.*, 2007; Guillouzo *et al.*, 2007]. Im Fall der HepaRG-Zellen wurde der Zusatz von 2% DMSO hauptsächlich gewählt um eine erhöhte CYP3A4-Expression zu erzielen und damit eine verbesserte Stoffwechselkompetenz. Die Expression der meisten anderen untersuchten Gene ist jedoch sowohl im Vergleich zu Leber als auch zu den primären Hepatozytenkulturen deutlich herabgesetzt. Außerdem machen die hepatozytenähnlichen Zellen nur etwa die Hälfte der Zellpopulation aus, das heißt die Expressionsergebnisse sind ein Durchschnittswert, gemeinsam mit den epithelialen Gallengangszellen. Generell wiesen die Zellkulturen primärer humaner Hepatozyten bzw. HepaRG geringere zeitliche Variationen der Genexpression im Vergleich zu den Zellkulturen primärer Rattenhepatozyten auf. Im Falle der humanen Leber-*in vitro*-Modelle waren diese klar voneinander getrennt, d.h. HepaRG-Zellen unterschieden sich deutlich von primären humanen Hepatozytenkulturen und beide Modelle deutlich von der Leber. Hepatozytensuspensionskulturen zeigten innerhalb der ersten sechs Stunden ein Verhalten, das der Leber sehr ähnlich ist und sind daher für sehr kurze Inkubationsbedingungen durchaus geeignet [Elaut *et al.*, 2006b]. Ein ähnliches Verhalten war für Suspensionskulturen primärer Rattenhepatozyten zu beobachten. Die Unterscheidung der einzelnen Ratten-Leber-*in vitro*-Modelle war anhand der Genexpression deutlich geringer ausgeprägt als bei den humanen Zellkulturen. Die starken zeitlichen Veränderungen in den Ratten-*in vitro*-Modellen waren am geringsten in den serumfreien Monolayer- bzw. Sandwichkulturen. Dies verdeutlicht erneut, dass diese Kulturmodelle, und vor allem die serumfreie Sandwichkultur, das am besten geeignete Leber-*in vitro*-Modell zur Untersuchung speziesspezifischer Substanzwirkungen im Rahmen einer toxikologischen Bewertung sind.

8. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Durch die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse wird deutlich, dass sich die unterschiedlichen Leber-*in vitro*-Modelle deutlich in ihren Eigenschaften unterscheiden. Allen gemeinsam ist die Tatsache, dass die *in vivo*-Situation nicht exakt nachgebildet werden kann. Die Überwindung dieses Problems wird wahrscheinlich nur durch sehr komplexe Gewebemodelle möglich sein. Die Arzneimitteltoxikologie ist bestrebt, möglichst viele Substanzen zu einem frühen Zeitpunkt in der Entwicklung zu testen, um problembehaftete Kandidaten vor der zeit- und kostenintensiven regulatorischen Testung auszusortieren. Dies erfordert ein nicht allzu komplexes *in vitro*-Modell, das Zugang zu einer Vielzahl analytischer Methoden bietet, die zum Teil automatisierbar sind, um einen erhöhten Durchsatz zu gewährleisten. Des Weiteren muss das Modell prädiktiv für mögliche auftretende Schädigungen im Menschen sein. Das heißt, es ist nicht unbedingt notwendig, ein Modell zu haben, das die physiologische Situation *in vivo* perfekt nachbildet, sondern ein System aus *in vitro*-Modell und untersuchter Parameter, welches eine *in vitro* – *in vivo*-Korrelation zur Situation im Menschen erlaubt. Dazu ist es notwendig, anhand einer gewissen Anzahl von Substanzen, für die klinische Befunde vorliegen, diese in Bezug zu den Ergebnissen des Testsystems zu setzen. Auf diese Art ist es möglich eine Datenbank zu erstellen, mit der die Testergebnisse einer neuen Substanz auf toxische Wirkungen im Menschen extrapoliert werden können.

Die am häufigsten verwendeten Assays zur Bestimmung von Zytotoxizität *in vitro* basieren auf der Bestimmung der Zellzahl, des Energiehaushalts bzw. der Zytoplasmamembranintegrität der Zellen [Barile *et al.*, 1994]. In einer umfangreichen Studie (The Multicenter Evaluation of *In Vitro* Cytotoxicity – MEIC) zeigten diese Methoden jedoch eine Vorhersagegenauigkeit von weniger als 50% für sub-lethale Toxizitäten *in vivo* [Clemedson *et al.*, 2000; Ekwall *et al.*, 2000]. Die am häufigsten verwendeten *in vitro*-Zytotoxizitätstests wiesen zwar eine Spezifität zur Vorhersage arzneimittelinduzierter Lebertoxizität von mehr als 90% auf, die Sensitivität lag jedoch meist bei $\leq 10\%$ [Xu *et al.*, 2004]. Allerdings liegt die Sensitivität der regulatorischen Tierstudien ebenso lediglich bei 52%. Durch die Kombination verschiedener Zytotoxizitätsparameter und deren Analyse durch High Content Imaging in HepG2 konnte die Spezifität und die Sensitivität auf mehr als 90% gesteigert werden [O'Brien *et al.*, 2006; O'Brien und Haskins, 2007]. Die eingeschränkte Biotransformationsaktivität von HepG2 schränkt deren Einsatz zur Bestimmung stoffwechselbedingter toxischer Wirkungen deutlich ein [Wilkening *et al.*, 2003], die Hepatomazelllinie gilt jedoch als geeignetes Modell zur Identifizierung allgemeiner Toxizität. Der Einsatz von Zellkulturen primärer Hepatozyten würde die Untersuchung von Substanzen

mit einem Stoffwechselprofil, das mehr der Situation *in vivo* entspricht, erlauben [Guillouzo, 1998; Hewitt *et al.*, 2001; Ponsoda *et al.*, 2001; Farkas und Tannenbaum, 2005].

Die Anwendung der multiparametrischen High Content Imaging Analyse in einer Kombination aus Lang- und Kurzzeitzellkulturen primärer Hepatozyten, aber auch Hepatomazelllinien, könnte ein geeigneter Weg sein um eine robuste *in vitro* – *in vivo*-Korrelation und die Vorhersage von Hepatotoxizität im Menschen zu erlauben, sowie Hinweise auf den Mechanismus der toxischen Wirkung zu bekommen [Vernetti *et al.*, 2008; Giuliano *et al.*, 2011]. Die größte Hürde zur Anwendung von *in vitro*-Modellen zur Vorhersage von Hepatotoxizität im Menschen dürfte jedoch die Anerkennung durch die Arzneimittelzulassungsbehörden sein. Trotz der bekannten Speziesunterschiede [Bort *et al.*, 1996] werden auf absehbare Zeit Tierversuche daher weiterhin der Standard zur toxikologischen Bewertung von Arzneimitteln bleiben. Da Speziesunterschiede auch *in vitro* nachweisbar sind [Martelli *et al.*, 2003], könnte der Beweis der Vorhersagekraft der *in vitro*-Modelle für die präklinischen Tiermodelle ein Weg zur Anerkennung sein. Dadurch könnte es möglich sein, eine Reduktion der notwendigen Tierversuche zu erreichen.

9. LITERATURVERZEICHNIS

- Aldridge, J. E., Gibbons, J. A., Flaherty, M. M., Kreider, M. L., Romano, J. A., und Levin, E. D. (2003). Heterogeneity of Toxicant Response: Sources of Human Variability. *Toxicol. Sci.* **76**, 3-20.
- Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le Charpentier, T., Langouet, S., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C., und Guillouzo, A. (2006). Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* **34**, 75-83.
- Ballet, F. (1997). Hepatotoxicity in drug development: detection, significance and solutions. *J Hepatol* **26 Suppl 2**, 26-36.
- Barile, F. A., Dierickx, P. J., und Kristen, U. (1994). In vitro cytotoxicity testing for prediction of acute human toxicity. *Cell Biol Toxicol* **10**, 155-162.
- Boelsterli, U. A. (2003). Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **192**, 307-322.
- Boelsterli, U. A., und Lim, P. L. K. (2007). Mitochondrial abnormalities--A link to idiosyncratic drug hepatotoxicity? *Toxicology and Applied Pharmacology* **220**, 92-107.
- Bort, R., Ponsoda, X., Carrasco, E., Gomez-Lechon, M. J., und Castell, J. V. (1996). Comparative metabolism of the nonsteroidal antiinflammatory drug, aceclofenac, in the rat, monkey, and human. *Drug Metab Dispos* **24**, 969-975.
- Brandon, E. F., Raap, C. D., Meijerman, I., Beijnen, J. H., und Schellens, J. H. (2003). An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol* **189**, 233-246.
- Cerec, V., Glaise, D., Garnier, D., Morosan, S., Turlin, B., Drenou, B., Gripon, P., Kremsdorf, D., Guguen-Guillouzo, C., und Corlu, A. (2007). Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology* **45**, 957-967.
- Clemedson, C., Barile, F. A., Chesné, C., Cottin, M., Curren, R., Ekwall, B., Ferro, M., José Gómez-Lechón, M., Imai, K., Janus, J., Kemp, R. B., Kerszman, G., Kjellstrand, P., Lavrijsen, K., Logemann, P., McFarlane-Abdulla, E., Roguet, R., Segner, H., Thuvander, A., Walum, E., und Ekwall, B. (2000). MEIC Evaluation of Acute Systemic Toxicity Part VII. Prediction of Human Toxicity by Results from Testing of the First 30 Reference Chemicals with 27 Further In Vitro Assays. *ATLA* **28**, 161-200.
- De Smet, K., Cavin, C., Vercruysse, A., und Rogiers, V. (2001). Collagen type I gel cultures of adult rat hepatocytes as a screening induction model for cytochrome P450-dependent enzymes. *Altern Lab Anim* **29**, 179-192.
- Ekwall, B., Ekwall, B., und Sjöström, M. (2000). MEIC Evaluation of Acute Systemic Toxicity Part VIII. Multivariate Partial Least Squares Evaluation, Including the Selection of a Battery of Cell Line Tests with a Good Prediction of Human Acute Lethal Peak Blood Concentrations for 50 Chemicals. *ATLA* **28**, 201-234.
- Elaut, G., Henkens, T., Papeleu, P., Snykers, S., Vinken, M., Vanhaecke, T., und Rogiers, V. (2006a). Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. *Curr Drug Metab* **7**, 629-660.

-
- Elaut, G., Papeleu, P., Vinken, M., Henkens, T., Snykers, S., Vanhaecke, T., und Rogiers, V. (2006b). Hepatocytes in suspension. *Methods Mol Biol* **320**, 255-263.
- Fahmi, O. A., Kish, M., Boldt, S., und Obach, R. S. (2010). Cytochrome P450 3A4 mRNA is a more reliable marker than CYP3A4 activity for detecting pregnane X receptor-activated induction of drug-metabolizing enzymes. *Drug Metab Dispos* **38**, 1605-1611.
- Farkas, D., und Tannenbaum, S. R. (2005). In vitro methods to study chemically-induced hepatotoxicity: a literature review. *Curr Drug Metab* **6**, 111-125.
- Fung, M., A. Thornton, K. Mybeck, W. Hsiao-Hui, K. Hornbuckle, E. Muniz (2001). Evaluation of the characteristics of safety withdrawal of prescription drugs from worldwide pharmaceutical markets--1960 to 1999. *Drug Information Journal* **35**, 293-317.
- Giuliano, K. A., Gough, A. H., Taylor, D. L., Verneti, L. A., und Johnston, P. A. (2011). Early safety assessment using cellular systems biology yields insights into mechanisms of action. *J Biomol Screen* **15**, 783-797.
- Godoy, P., Hengstler, J. G., Ilkavets, I., Meyer, C., Bachmann, A., Muller, A., Tuschl, G., Mueller, S. O., und Dooley, S. (2009). Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor beta-induced apoptosis. *Hepatology* **49**, 2031-2043.
- Gomez-Lechon, M. J., Donato, M. T., Castell, J. V., und Jover, R. (2004). Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man. *Curr Drug Metab* **5**, 443-462.
- Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Canie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., und Guguen-Guillouzo, C. (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15655-15660.
- Groneberg, D. A., Grosse-Siestrup, C., und Fischer, A. (2002). In vitro models to study hepatotoxicity. *Toxicol Pathol* **30**, 394-399.
- Guengerich, F. P., und MacDonald, J. S. (2007). Applying Mechanisms of Chemical Toxicity to Predict Drug Safety. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 344-369.
- Guillouzo, A. (1998). Liver cell models in in vitro toxicology. *Environ Health Perspect* **106**, 511-532.
- Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F., und Guguen-Guillouzo, C. (2007). The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact* **168**, 66-73.
- Hartung, T., und Gribaldo, L. (2004). New hepatocytes for toxicology? *Trends Biotechnol* **22**, 613-615; discussion 615-616.
- He, K., Talaat, R. E., Pool, W. F., Reily, M. D., Reed, J. E., Bridges, A. J., und Woolf, T. F. (2004). Metabolic activation of troglitazone: identification of a reactive metabolite and mechanisms involved. *Drug Metab Dispos* **32**, 639-646.
- Helfgott, S. M., Sandberg-Cook, J., Zakim, D., und Nestler, J. (1990). Diclofenac-associated hepatotoxicity. *JAMA* **264**, 2660-2662.

-
- Hewitt, N. J., Buhning, K. U., Dasenbrock, J., Haunschild, J., Ladstetter, B., und Utesch, D. (2001). Studies comparing in vivo:in vitro metabolism of three pharmaceutical compounds in rat, dog, monkey, and human using cryopreserved hepatocytes, microsomes, and collagen gel immobilized hepatocyte cultures. *Drug Metab Dispos* **29**, 1042-1050.
- Hewitt, N. J., Lechon, M. J., Houston, J. B., Halifax, D., Brown, H. S., Maurel, P., Kenna, J. G., Gustavsson, L., Lohmann, C., Skonberg, C., Guillouzo, A., Tuschl, G., Li, A. P., LeCluyse, E., Groothuis, G. M., und Hengstler, J. G. (2007a). Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev* **39**, 159-234.
- Hewitt, N. J., Lecluyse, E. L., und Ferguson, S. S. (2007b). Induction of hepatic cytochrome P450 enzymes: methods, mechanisms, recommendations, and in vitro-in vivo correlations. *Xenobiotica* **37**, 1196-1224.
- Huang, S. M., und Stifano, T. (2006). FDA - Guidance for Industry: Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling - DRAFT GUIDANCE.
- Kaplowitz, N. (2005). Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 489-499.
- Kmiec, Z. (2001). Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **161**, III-XIII, 1-151.
- Kola, I., und Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery* **3**, 711-716.
- Kresse, M., Latta, M., Kunstle, G., Riehle, H. M., van Rooijen, N., Hentze, H., Tiegs, G., Biburger, M., Lucas, R., und Wendel, A. (2005). Kupffer cell-expressed membrane-bound TNF mediates melphalan hepatotoxicity via activation of both TNF receptors. *J Immunol* **175**, 4076-4083.
- Lee, W. M. (2003). Drug-Induced Hepatotoxicity. *N Engl J Med* **349**, 474-485.
- Lee, W. M., und Senior, J. R. (2005). Recognizing drug-induced liver injury: current problems, possible solutions. *Toxicol Pathol* **33**, 155-164.
- Luyendyk, J. P., Maddox, J. F., Cosma, G. N., Ganey, P. E., Cockerell, G. L., und Roth, R. A. (2003). Ranitidine Treatment during a Modest Inflammatory Response Precipitates Idiosyncrasy-Like Liver Injury in Rats. *J Pharmacol Exp Ther* **307**, 9-16.
- Marion, T. L., Leslie, E. M., und Brouwer, K. L. (2007). Use of sandwich-cultured hepatocytes to evaluate impaired bile acid transport as a mechanism of drug-induced hepatotoxicity. *Mol Pharm* **4**, 911-918.
- Martelli, A., Mattioli, F., Angiola, M., Reimann, R., und Brambilla, G. (2003). Species, sex and inter-individual differences in DNA repair induced by nine sex steroids in primary cultures of rat and human hepatocytes. *Mutat Res* **536**, 69-78.
- Mertsching, H., Walles, T., Hofmann, M., Schanz, J., und Knapp, W. H. (2005). Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation. *Biomaterials* **26**, 6610-6617.

-
- Murphy, E. J., Davern, T. J., Shakil, A. O., Shick, L., Masharani, U., Chow, H., Freise, C., Lee, W. M., und Bass, N. M. (2000). Troglitazone-induced fulminant hepatic failure. Acute Liver Failure Study Group. *Dig Dis Sci* **45**, 549-553.
- Neuschwander-Tetri, B. A., Isley, W. L., Oki, J. C., Ramrakhiani, S., Quiason, S. G., Phillips, N. J., und Brunt, E. M. (1998). Troglitazone-induced hepatic failure leading to liver transplantation. A case report. *Ann Intern Med* **129**, 38-41.
- O'Brien, P., und Haskins, J. R. (2007). In vitro cytotoxicity assessment. *Methods Mol Biol* **356**, 415-425.
- O'Brien, P., Irwin, W., Diaz, D., Howard-Cofield, E., Krejsa, C., Slaughter, M., Gao, B., Kaludercic, N., Angeline, A., Bernardi, P., Brain, P., und Hougham, C. (2006). High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Arch Toxicol* **80**, 580-604.
- Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monro, A., Kolaja, G., Lilly, P., Sanders, J., Sipes, G., Bracken, W., Dorato, M., Van Deun, K., Smith, P., Berger, B., und Heller, A. (2000). Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol* **32**, 56-67.
- Parent, R., Marion, M. J., Furio, L., Trepo, C., und Petit, M. A. (2004). Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology* **126**, 1147-1156.
- Ponsoda, X., Pareja, E., Gomez-Lechon, M. J., Fabra, R., Carrasco, E., Trullenque, R., und Castell, J. V. (2001). Drug biotransformation by human hepatocytes. In vitro/in vivo metabolism by cells from the same donor. *Journal of Hepatology* **34**, 19-25.
- Richert, L., Alexandre, E., Lloyd, T., Orr, S., Viollon-Abadie, C., Patel, R., Kingston, S., Berry, D., Dennison, A., Heyd, B., Manton, G., und Jaeck, D. (2004). Tissue collection, transport and isolation procedures required to optimize human hepatocyte isolation from waste liver surgical resections. A multilaboratory study. *Liver Int* **24**, 371-378.
- Richert, L., Liguori, M. J., Abadie, C., Heyd, B., Manton, G., Halkic, N., und Waring, J. F. (2006). Gene expression in human hepatocytes in suspension after isolation is similar to the liver of origin, is not affected by hepatocyte cold storage and cryopreservation, but is strongly changed after hepatocyte plating. *Drug Metab Dispos* **34**, 870-879.
- Roberts, R. A., Chevalier, S., Hasmall, S. C., James, N. H., Cosulich, S. C., und Macdonald, N. (2002). PPAR alpha and the regulation of cell division and apoptosis. *Toxicology* **181-182**, 167-170.
- Roth, R. A., Luyendyk, J. P., Maddox, J. F., und Ganey, P. E. (2003). Inflammation and drug idiosyncrasy--is there a connection? *J Pharmacol Exp Ther* **307**, 1-8.
- Russell, W. M. S., und Burch, R. L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. Reprinted by UFAW, England, 1992, London.
- Schug, M., Heise, T., Bauer, A., Storm, D., Blaszkewicz, M., Bedawy, E., Brulport, M., Geppert, B., Hermes, M., Follmann, W., Rapp, K., Maccoux, L., Schormann, W., Appel, K. E., Oberemm, A., Gundert-Remy, U., und Hengstler, J. G. (2008). Primary rat hepatocytes as in vitro system for gene expression studies: comparison of sandwich, Matrigel and 2D cultures. *Arch Toxicol* **82**, 923-931.

-
- Shaw, P. J., Hopfensperger, M. J., Ganey, P. E., und Roth, R. A. (2007). Lipopolysaccharide and trovafloxacin coexposure in mice causes idiosyncrasy-like liver injury dependent on tumor necrosis factor- α . *Toxicol Sci* **100**, 259-266.
- Smith, M. T. (2003). Mechanisms of troglitazone hepatotoxicity. *Chem Res Toxicol* **16**, 679-687.
- Tachibana, T., Kato, M., Takano, J., und Sugiyama, Y. (2011). Predicting Drug-Drug Interactions Involving the Inhibition of Intestinal CYP3A4 and P-Glycoprotein. *Curr Drug Metab*.
- Tang, W. (2003). The metabolism of diclofenac--enzymology and toxicology perspectives. *Curr Drug Metab* **4**, 319-329.
- Tugwood, J. D., Aldridge, T. C., Lambe, K. G., Macdonald, N., und Woodyatt, N. J. (1996). Peroxisome proliferator-activated receptors: structures and function. *Ann NY Acad Sci* **804**, 252-265.
- Utrecht, J. (2007). Idiosyncratic drug reactions: current understanding. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**, 513-539.
- Ulrich, R. G., Bacon, J. A., Cramer, C. T., Peng, G. W., Petrella, D. K., Stryd, R. P., und Sun, E. L. (1995). Cultured hepatocytes as investigational models for hepatic toxicity: practical applications in drug discovery and development. *Toxicol Lett* **82-83**, 107-115.
- Uyama, N., Shimahara, Y., Kawada, N., Seki, S., Okuyama, H., Imuro, Y., und Yamaoka, Y. (2002). Regulation of cultured rat hepatocyte proliferation by stellate cells. *J Hepatol* **36**, 590-599.
- Verneti, L. A., Irwin, W., Giuliano, K. A., Gough, A. H., Johnston, K., und Taylor, D. L. (2008). *Cellular Systems Biology Applied to Preclinical Safety Testing: A Case Study of CellCiphrTM Profiling*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Waring, J. F., Liguori, M. J., Luyendyk, J. P., Maddox, J. F., Ganey, P. E., Stachlewitz, R. F., North, C., Blomme, E. A., und Roth, R. A. (2006). Microarray analysis of lipopolysaccharide potentiation of trovafloxacin-induced liver injury in rats suggests a role for proinflammatory chemokines and neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther* **316**, 1080-1087.
- Westerink, W. M., und Schoonen, W. G. (2007a). Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* **21**, 1581-1591.
- Westerink, W. M., und Schoonen, W. G. (2007b). Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* **21**, 1592-1602.
- Wilkening, S., Stahl, F., und Bader, A. (2003). Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos* **31**, 1035-1042.
- Wysowski, D. K., und Swartz, L. (2005). Adverse drug event surveillance and drug withdrawals in the United States, 1969-2002: the importance of reporting suspected reactions. *Arch Intern Med* **165**, 1363-1369.

Xu, J. J., Diaz, D., und O'Brien, P. J. (2004). Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. *Chem Biol Interact* **150**, 115-128.

Yeung, K. Y., und Ruzzo, W. L. (2001). Principal component analysis for clustering gene expression data. *Bioinformatics* **17**, 763-774.

ANHANG: SONDERDRUCKE DER EIGENEN PUBLIKATIONEN

Anhang 1: S.O. Mueller, Y. Fery, **G. Tuschl**, D. Schrenk, Species-specific activation of nuclear receptors correlates with the response of liver drug metabolizing enzymes to EMD 392949 in vitro, *Toxicol Lett.* 193(1) (2010) 120-123.

Anhang 2: G. Tuschl, J. Hrach, Y. Walter, P.G. Hewitt, S.O. Mueller, Serum-free collagen sandwich cultures of adult rat hepatocytes maintain hepatotypic properties long term: A valuable model for in vitro toxicity and drug-drug interaction studies, *Chem Biol Interact* 181(1) (2009) 124-137.

Anhang 3: P. Godoy, J.G. Hengstler, I. Ilkavets, C. Meyer, A. Bachmann, A. Muller, **G. Tuschl**, S.O. Mueller, S. Dooley, Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor beta-induced apoptosis, *Hepatology* 49(6) (2009) 2031-2043.

Anhang 4: L. Richert, **G. Tuschl**, C. Abadie, N. Blanchard, D. Pekthong, G. Manton, J.C. Weber, S.O. Mueller, Use of mRNA expression to detect the induction of drug metabolising enzymes in rat and human hepatocytes, *Toxicol Appl Pharmacol* 235(1) (2009) 86-96.

Anhang 5: B. Lauer, **G. Tuschl**, M. Kling, S.O. Mueller, Species-specific toxicity of diclofenac and troglitazone in primary human and rat hepatocytes, *Chem Biol Interact* 179(1) (2009) 17-24.

Anhang 6: L. Richert, **G. Tuschl**, C. Viollon-Abadie, N. Blanchard, A. Bonet, B. Heyd, N. Halkic, E. Wimmer, H. Dolgos, S.O. Mueller, Species differences in the response of liver drug-metabolizing enzymes to (S)-4-O-tolylsulfanyl-2-(4-trifluormethyl-phenoxy)-butyric acid (EMD 392949) in vivo and in vitro, *Drug Metab Dispos* 36(4) (2008) 702-714.

Anhang 7: S.O. Mueller, **G. Tuschl**, M. Kling, Alternatives in pharmaceutical toxicology: global and focussed approaches—two case studies, ALTEX 24(2) (2007) 117-124.

Anhang 8: G. Tuschl, S.O. Mueller, Effects of cell culture conditions on primary rat hepatocytes - Cell morphology and differential gene expression, Toxicology 218(2-3) (2006) 205-215.

Anhang 9: G. Tuschl, B. Lauer, S.O. Mueller, Primary hepatocytes as a model to analyze species-specific toxicity and drug metabolism, Expert Opin Drug Metab Toxicol 4(7) (2008) 855-870.

Anhang 10: N.J. Hewitt, M.J. Lechon, J.B. Houston, D. Hallifax, H.S. Brown, P. Maurel, J.G. Kenna, L. Gustavsson, C. Lohmann, C. Skonberg, A. Guillouzo, **G. Tuschl**, A.P. Li, E. LeCluyse, G.M. Groothuis, J.G. Hengstler, Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies, *Drug Metab Rev* 39(1) (2007) 159-234.

Anhang 11: G. Tuschl, J. Hrach, P. Hewitt, S.O. Mueller, Application of Short and Long-Term Hepatocyte Cultures to Predict Toxicities, in: S.C. Sahu (Ed.), *Hepatotoxicity: From genomics to in vitro and in vivo models*, John Wiley & Sons, Chichester, UK, (2007) 141-174.

WEITERE VERÖFFENTLICHUNGEN

Poster:

EUROTOX, 44th Congress of the European Societies of Toxicology, Amsterdam (Netherlands), October 2007: **G. Tuschl**, J. Hrach, L. Richert, C. Chesné, P.G. Hewitt, S.O. Mueller, Long-Term Cell Culture Models For The Analysis Of Hepatotoxicity In Vitro

SBMC, Conference on Systems Biology of Mammalian Cells, Heidelberg, Juli 2006: **Tuschl, G.**, Hrach, J., Kramer, P.-J., Mueller, S.O., Hewitt, P.G. Gene expression analysis reveals species- and donor-specific action of mixed and selective PPAR agonists

Keystone Symposia, Nuclear Receptors: Orphan Brothers/Steroid Sisters, Banff (Alberta, Canada), March 2006: **G. Tuschl**, A.v. Heydebreck, P.G. Hewitt, S.O. Mueller, Gene expression profiling delineates species-specific action of mixed and selective PPAR agonists

47. Jahrestagung der DGPT, Mainz, April 2006: **G. Tuschl**, A.v. Heydebreck, P.G. Hewitt, S.O. Mueller, Gene expression profiling delineates species-specific action of mixed and selective PPAR agonists, Archives of Pharmacology 372 (Suppl.1), 128

46. Jahrestagung der DGPT, Mainz, März 2005: **G. Tuschl**, J. Hrach, P.G. Hewitt, S.O. Mueller, Effects of cell culture conditions on primary rat hepatocytes – cell morphology and differential gene expression, Archives of Pharmacology 371 (Suppl.1), R127

Vorträge:

Applications of Toxicogenomics in Drug Safety Assessment Conference, London (England), 2007 (invited lecture): **G. Tuschl**, S.O. Mueller, Focused approaches to characterize hepatotoxicity

48. Jahrestagung der DGPT, Mainz, März 2007: **G. Tuschl**, J. Hrach, P.G. Hewitt, S.O. Mueller, Functional Characterisation of Long-term Primary Rat Hepatocyte Cultures as a Model for Repeat-Dose Toxicity, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Vol 375(1), 481

Application of Toxicogenomics in Pharmaceutical Drug Safety Assessment Conference, Informa Drug Discovery Series, Basel (Switzerland), October 2006 (invited lecture): **G. Tuschl**, S.O. Mueller, Global and focused approaches to characterize hepatotoxicity

Toxicogenomics Meeting, Merck KGaA, Darmstadt (Germany) 13 October 2005: **G. Tuschl**, Establishment of sandwich hepatocyte culture method for molecular testing I: Cell functionality

LEBENS LAUF

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst und mit keinen anderen als den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verfasst habe.

Ebenso erkläre ich, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation weder in dieser noch in ähnlicher Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder in einer anderen Fakultät vorgelegt habe.

Ort:.....

Datum:.....

Unterschrift:.....